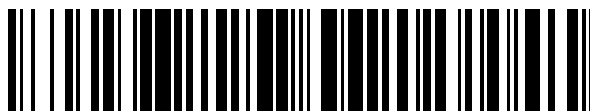


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 932**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/34 (2015.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2013 PCT/SE2013/000112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011095**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013 E 13753363 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2872620**

54 Título: **Derivación y autorrenovación de células Isl1+ y usos de las mismas**

30 Prioridad:

12.07.2012 US 201261670640 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.08.2020

73 Titular/es:

**ISLESTONE AB (100.0%)
Backvindeln 9
129 42 Hägersten, SE**

72 Inventor/es:

**GRINNEMO, KARL-HENRIK;
SIMONSON, OSCAR;
CORBASCIO, MATTHIAS;
SYLVÉN, CHRISTER y
WÄRDELL, EVA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 777 932 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivación y autorrenovación de células Isl1^+ y usos de las mismas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere, entre otros, a métodos para derivar células Isl1^+ multipotentes (es decir, a métodos para inducir a una célula a entrar en un linaje Isl1^+ multipotente) y a métodos para diferenciar células Isl1^+ en células cardíacas. En el presente documento también se dan a conocer células que pueden obtenerse mediante tales métodos, kits y composiciones para llevar a cabo los métodos según la invención, y también aplicaciones médicas de dichas células.

Técnica anterior

15 El recambio de cardiomiocitos es bajo en el corazón adulto, pero puede aumentar durante la isquemia a través de regulación por incremento de células progenitoras cardíacas multipotentes positivas para Isl1^+ (o positivas para C-Kit (C-Kit+)) (Genead *et al.*, PlosOne 7, e36804 (2012)). La regulación por incremento de células progenitoras endógenas no es suficiente para reemplazar la musculatura dañada después de un daño isquémico sustancial, dando como resultado insuficiencia cardíaca. Un enfoque atractivo para prevenir el desarrollo de insuficiencia cardíaca sería proporcionar células progenitoras que puedan reparar el daño tisular en el corazón. Estas células progenitoras deben poder dar lugar a cardiomiocitos, células de músculo liso, células nerviosas y endotelio. Las células Isl1^+ tienen esta capacidad y forman 2/3 del corazón en desarrollo, incluyendo el nodo sinoauricular (SA), parte del nodo auriculoventricular (AV), la aurícula derecha, el ventrículo derecho, la aorta proximal, el tronco de las arterias pulmonares y partes proximales de las arterias coronarias (Lam *et al.*, Pediatr. Cardiol 30, 690 (2009)).

25 Sin embargo, una limitación considerable en el uso de estas células progenitoras para la medicina regenerativa se refiere a la dificultad de expandir poblaciones de células progenitoras clonales bien caracterizadas, o bien de tejido humano adulto o bien de tejidos de células madre fetales/embrionarias. En un estudio anterior, Laugwitz y colaboradores demostraron que era posible expandir células Isl1^+ posnatales de ratones transgénicos si se cultivaban conjuntamente con células alimentadoras mesenquimatosas cardíacas (Laugwitz *et al.*, Nature 433, 647 (2005)).

35 Los documentos WO 2010/011352 y US 2011/305672 describen métodos para la generación y el mantenimiento de progenitores multipotentes Isl1^+ (IMP) derivados de mesodermo, composiciones de los mismos y métodos para producir una variedad de células progenitoras multipotentes. Domogatskaya y colaboradores dan a conocer que diferentes isoformas de laminina tienen un impacto diferente sobre la renovación de células madre (Domogatskaya *et al.*, en: "Stem Cells" (Alphamed Press Inc., Estados Unidos), 2008, vol. 26, n.º 11, páginas 2800-2809. El documento WO 2005/046596 da a conocer composiciones que comprenden lamininas y agonistas de wnt.

40 Por tanto, existe una gran necesidad en la técnica de métodos que permitan eficazmente la formación de progenitores cardiovasculares y el mantenimiento y la expansión de estos progenitores cardiovasculares en un estado multipotente para permitir la generación de un conjunto diverso de linajes cardíacos. Un método deseado permitiría la producción y posterior expansión ilimitada de progenitores que puedan entrar en diferentes linajes cardíacos. Tal método es altamente deseable ya que evitará muchos de los problemas relacionados con el rechazo de tejidos comúnmente asociado con las terapias de trasplante, y en general proporcionará estrategias alternativas de medicina regenerativa y mejorará los resultados de tratamiento para pacientes que padecen una variedad de trastornos cardíacos y cardiovasculares.

Sumario de la invención

50 Por tanto, un objeto de la presente invención es superar los problemas identificados anteriormente y satisfacer las necesidades existentes en la técnica, es decir, proporcionar una derivación fácil y eficaz de células Isl1^+ multipotentes usando métodos claramente definidos y altamente controlables. Además, la presente invención permite no sólo la derivación eficaz de células Isl1^+ multipotentes, sino también la autorrenovación y proliferación sustancialmente indefinidas (es decir, expansión clonal) de dichas células Isl1^+ multipotentes, así como la diferenciación celular, por ejemplo para dar lugar a tejido cardíaco. Las células que pueden obtenerse usando los métodos según la presente invención son muy adecuadas para diversas aplicaciones clínicas y muestran fuerte capacidad de direccionamiento a tejidos y sitios de interés, por ejemplo, tejido cardíaco después de la diferenciación en cardiomiocitos. Específicamente, las células Isl1^+ que se han diferenciado en tejido cardíaco, usando los métodos de derivación y diferenciación según la presente invención, se dirigen intensamente a regiones infartadas (isquémicas) del corazón, donde se alargan y se disponen en paralelo con los cardiomiocitos circundantes.

La presente invención se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a métodos para derivar células Isl1^+ multipotentes (es decir, a métodos para inducir a una célula a entrar en un linaje Isl1^+ multipotente). Tales métodos pueden comprender la etapa de cultivar una célula mesenquimatosas (también conocida como célula madre mesenquimatosas (MSC)), por ejemplo, una célula

procedente de una fracción de células mesenquimatosas, en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ (la cadena $\alpha 5$ está representada por la SEQ ID No 3), y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, y continuar cultivando el cultivo celular durante un período de tiempo suficiente para derivar las células $Isl1^+$ (y/o una población suficiente de células $Isl1^+$).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a métodos para la autorrenovación de células $Isl1^+$ multipotentes, comprendiendo dichos métodos las etapas de (i) cultivar células que pueden obtenerse a través de los métodos según el aspecto descrito anteriormente en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt; y, (ii) mantener y/o expandir las células que pueden obtenerse a partir de la etapa (i) en cultivo celular. En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para diferenciar células $Isl1^+$ en células cardíacas (por ejemplo cardiomiocitos, células del músculo liso y/o células endoteliales cardíacas). También se dan a conocer en el presente documento células que pueden obtenerse mediante los métodos según la invención, en particular células $Isl1^+$ multipotentes y células $Isl1^+$ diferenciadas en células cardíacas (que normalmente expresan, por ejemplo, troponina T y otros marcadores para células cardíacas) (tanto las células $Isl1^+$ multipotentes como las células $Isl1^+$ diferenciadas en cardiomiocitos pueden criopreservarse opcionalmente).

También se dan a conocer en el presente documento composiciones y kits (por ejemplo, kits de partes) para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Las composiciones pueden comprender al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, y el kit (es decir, un kit de partes), de manera similar, puede comprender al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y un medio de cultivo celular que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt. También se dan a conocer en el presente documento kits y/o composiciones para diferenciar células (en particular células $Isl1^+$) en cardiomiocitos. Tales kits pueden comprender al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y cualquier combinación de las mismas. Los componentes del kit (por ejemplo, la laminina y el agente de activación de Wnt) pueden proporcionarse ventajosamente en recipientes independientes (por ejemplo viales, ampollas, tubos, o similares), con el fin de permitir combinar los componentes cuando se llevan a cabo los métodos según la presente invención. Las lamininas de los kits y/o las composiciones pueden proporcionarse o bien en un medio adecuado, liofilizadas, o bien recubiertas en placas/material de plástico adecuado para el cultivo celular.

En el presente documento se dan a conocer adicionalmente las células tal como se describe en el presente documento para su uso en medicina. Más específicamente, las células pueden usarse en el tratamiento y/o la profilaxis de insuficiencia cardíaca, fallo cardíaco, infarto de miocardio y/o enfermedad cardíaca congénita debido a defectos cardíacos que afectan a partes derivadas del segundo campo cardíaco (por ejemplo, aurícula derecha, ventrículo derecho, infundíbulos (aorta, arterias pulmonares) y tabique interventricular). También se dan a conocer en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden células tal como se da a conocer en el presente documento, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en medicina, por ejemplo para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de insuficiencia cardíaca, fallo cardíaco, infarto de miocardio y/o enfermedad cardíaca congénita debido a defectos cardíacos que afectan a partes derivadas del segundo campo cardíaco (por ejemplo, aurícula derecha, ventrículo derecho, infundíbulos (aorta, arterias pulmonares) y tabique interventricular).

También se dan a conocer en el presente documento métodos de tratamiento para mejorar, aliviar o prevenir insuficiencia cardíaca, fallo cardíaco, infarto de miocardio y/o enfermedad cardíaca congénita debido a defectos cardíacos que afectan a partes derivadas del segundo campo cardíaco (por ejemplo aurícula derecha, ventrículo derecho, infundíbulos (aorta, arterias pulmonares) y tabique interventricular) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las células tal como se da a conocer en el presente documento.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una combinación de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, para derivar una célula $Isl1^+$ multipotente. En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de laminina 211, laminina 221 y/o cualquier combinación de las mismas para diferenciar células (preferiblemente células $Isl1^+$ según la presente invención) en células cardíacas, por ejemplo cardiomiocitos.

Por tanto, la presente invención proporciona métodos para derivar células $Isl1^+$ multipotentes, para autorrenovar tales células y para diferenciar tales células en células cardíacas, con eficacia considerablemente mejorada, menos variabilidad, en condiciones definidas clínicamente aceptables, y con control potenciado en comparación con los métodos de la técnica actual. Las composiciones y los kits tal como se da a conocer en el presente documento facilitan llevar a cabo los métodos según la presente invención, permitiendo el cultivo y la manipulación fáciles, para fines tanto clínicos como experimentales.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Derivación de células $Isl1^+$ de células madre mesenquimatosas cardíacas embrionarias de rata o de

médula ósea de rata. (a) En la fracción inicial de células madre adherentes, sólo había un pequeño número de células $Isl1^+$ (<1%) (en el tejido cardíaco se mezclaron con cardiomiocitos que expresaban α -actinina cardíaca). Durante la primera semana de cultivo en un medio de Wnt en laminina 511, laminina 521, o una combinación de las dos, las células madre mesenquimatosas se convirtieron en células que expresan $Isl1$. Junto con las células $Isl1^+$, había más células diferenciadas que expresaban α -actinina cardíaca. Durante pases posteriores, la proporción relativa de células que expresaban α -actinina cardíaca se redujo y después de dos semanas en cultivo (5 pases), el 73 $\pm$ 18% de las células expresaron $Isl1$ y no quedaban células diferenciadas. (b) En el plazo de dos semanas de cultivo, la fracción inicial se había expandido 16 veces. (c) El análisis de inmunotransferencia de tipo Western confirmó la activación de la ruta Wnt/ β -catenina en las células $Isl1^+$ cultivadas, demostrando niveles aumentados tanto de Lrp6 fosforilada en serina 1490 como de β -catenina (ABC) activa (desfosforilada) en comparación con la fracción inicial de células adherentes. En el panel a, las barras representan 50 μ m.

Figura 2. Derivación de células $Isl1^+$ de médula ósea, sangre de cordón umbilical y células madre mesenquimatosas cardíacas (MSC) fetales/embrionarias. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental usado para generar y expandir células $Isl1^+$ multipotentes procedentes de una fracción de células madre mesenquimatosas. (B) Antes del inicio del protocolo de Wnt y laminina, menos del 5% de la fracción de células madre mesenquimatosas expresaba $Isl1$ (cuando se usó tejido cardíaco fetal/embrionario, estas células se mezclaron con células que expresaban α -actinina cardíaca (α -act)). (C) Durante la primera semana en cultivo en al menos una laminina que contenía α 5 y en el medio de Wnt, la fracción de células madre mesenquimatosas se convirtió en células que expresaban $Isl1$. (D) Después de dos semanas de cultivo, el 92 $\pm$ 2% de las células eran positivas para $Isl1$ y más del 40% de las células todavía proliferaban expresando Ki67. (E) Las células $Isl1^+$ cultivadas podían diferenciarse en células que expresan α -actinina cardíaca, factor de von Willebrand (vWF) y actina de músculo liso (SMA). (F) Después de tres semanas de cultivo, la población de células $Isl1^+$ se había expandido más de 1000 veces. Con el fin de verificar el protocolo, se cultivó la fracción inicial de células madre mesenquimatosas en diferentes condiciones: medio de Wnt + al menos una laminina que contiene α 5, medio de Wnt + material de plástico, medio sin Wnt3a + al menos una laminina que contiene α 5 y medio sin Wnt3a + material de plástico. (G) El análisis de qRT-PCR demuestra que la combinación de medio de Wnt y al menos una laminina que comprende una cadena α 5 (por ejemplo, o bien laminina 511 (una composición que comprende la SEQ ID No. 3, la SEQ ID No. 4 y la SEQ ID No. 6) o bien laminina 521 (una composición que comprende SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 y SEQ ID No. 6) o una combinación de las dos) es necesaria para la derivación y expansión de células $Isl1^+$ indiferenciadas. En los paneles B a E, la tinción nuclear con DAPI se muestra en magenta. Las células de cotinción para $Isl1$ y magenta se muestran en blanco. Las barras representan 50 μ m. En el panel F, las barras de error representan la media $\pm$ DE. En la figura: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 3. Análisis de citometría de flujo de la fracción adherente procedente de un aspirado humano de corazón y médula ósea fetales/embrionarios de donantes humanos sanos. Las células expresaron los marcadores de células madre mesenquimatosas CD105, CD90, CD73 y CD44, mientras que fueron negativas para los marcadores de linaje hematopoyético CD14, CD19, CD34, CD45 y el marcador endotelial CD31.

Figura 4. Matrices cromáticas representativas de los perfiles de expresión génica de células $Isl1^+$ cultivadas en comparación con células presentes *in vivo* en las regiones positivas y negativas para $Isl1$ de un corazón fetal. El origen de las células es (A) rata y (B) ser humano. Se presenta la unión promedio y la transformación $\log_2$ de las señales. La escala de color de la matriz cromática varía desde el rojo (alta expresión) pasando por el negro (expresión promedio) hasta el verde (baja expresión).

Figura 5. Matriz cromática representativa del perfil de expresión génica y análisis de citometría de flujo que define diferentes poblaciones progenitoras de las células $Isl1^+$ humanas cultivadas. (A) Se aisló el ARN total de regiones positivas para $Isl1$ (positivas para $Isl1$, glóbulos rojos) y negativas para $Isl1$ (negativas para $Isl1$) de un corazón fetal humano (9,5 semanas) y a través de microdissección de captura por láser. En la figura: OFT: infundíbulo; LA: aurícula izquierda; LV: ventrículo izquierdo; RA: aurícula derecha; RV: ventrículo derecho. Los núcleos se tiñen de azul por DAPI. La barra representa 50 μ m. (B) Matriz cromática: las células $Isl1^+$ humanas cultivadas (obtenidas de corazón fetal humano) tenían una mayor expresión de $Isl1$ que la región positiva para $Isl1$ del corazón embrionario humano, y la expresión de marcadores de diferenciación fue mucho menor. La expresión de marcadores de pluripotencia de las células $Isl1^+$ cultivadas aumentó durante el procedimiento de cultivo (de 2 a 3 semanas). En la figura, se presentan la unión promedio y la transformación $\log_2$ de las señales. La escala de colores de la matriz cromática varía desde el rojo (alta expresión) pasando por el amarillo hasta el azul (baja expresión). (C) En el análisis de citometría de flujo de corazón humano fetal, se excluyeron las MSC de sangre de cordón umbilical humano y las MSC de médula ósea humana, las poblaciones de células CD34+ y CD45+ (y esto puede ser realizarse preferiblemente en determinadas circunstancias). Todas las células $Isl1^+$ humanas coexpresan KDR, el 59,5% SSEA-1 y el 4,3% c-kit. Todas las células SSEA-1+ coexpresan KDR, y constituyen el 2,7% de la población de células c-kit+.

Figura 6. Detección por inmunohistoquímica de las células $Isl1^+$ de rata implantadas (obtenidas o bien de corazón embrionario o fetal o bien de médula ósea de rata) marcadas con transposones que expresan β -gal y luciferasa. (A) Tinción con hematoxilina y eosina que demuestra el sitio de inyección de células $Isl1^+$ marcadas en la pared

ventricular izquierda. Veinticuatro horas después de la inyección, la tinción con X-gal identificó las células Isl1⁺ marcadas (células azules) tanto en el sitio de inyección (parte insertada en la figura A) como en la región del infundíbulo cerca de la PA y la Ao (parte insertada en la figura B). Después de dos semanas, pudieron detectarse pocas células Isl1⁺ en el sitio de inyección (C). Estas células habían cambiado su aspecto y eran alargadas y estaban organizadas en paralelo a los cardiomiocitos circundantes. (D, E) Cuando se inyectaron células Isl1⁺ marcadas en la región periisquémica del ventrículo izquierdo, la mayoría de las células permanecieron en la zona de infarto (parte insertada en la figura D) y se encontraron pocas células en la región del infundíbulo 24 horas después de la inyección (parte insertada en la figura E). (F) Después de dos semanas, todavía se encontraron células Isl1⁺ marcadas en la zona de infarto y nuevamente las células implantadas estaban alargadas e intercaladas entre los cardiomiocitos circundantes (parte insertada en la figura F). En las figuras, las barras representan 1000 μ m y en la parte insertada 100 μ m. Abreviaturas; Ao: aorta; PA: arteria pulmonar; RA: aurícula derecha; LV: ventrículo izquierdo.

Figura 7 Estudio de supervivencia *in vivo* y migración de células Isl1⁺ de rata (obtenidas o bien de médula ósea o bien de corazón embrionario) marcadas con transposones que expresan β -gal y luciferasa y. (A) Se inyectaron células Isl1⁺ marcadas en la pared ventricular izquierda de un corazón de rata normal, donde el sistema de obtención de imágenes *in vitro* (sistema IVIS) detectó una señal intensa algunas horas después de la inyección. (B) Después de 24 horas, se detectó la señal más intensa en una región correspondiente al infundíbulo, donde permaneció durante el período de detección de una semana (C). En la siguiente etapa se inyectaron células Isl1⁺ marcadas en la pared ventricular izquierda de un corazón normal. En el plazo de 24 horas, se detectó la señal más intensa en la región del infundíbulo (D). Después de la inducción de infarto de miocardio, la señal más intensa se detectó nuevamente en la región isquémica, donde aumentó desde las 24 horas (E) hasta una semana después del infarto (F). (G) Inyección de células Isl1⁺ marcadas en una vena de la cola, 8 horas después de la inducción de infarto de miocardio. Las células Isl1⁺ parecían dirigirse a la región de infarto donde la señal era la más más intensa. La señalización también puede observarse en los pulmones, lo que probablemente sea indicativo de que algunas de las células se mantienen en la red capilar de los pulmones.

Figura 8. Laminina que comprende la cadena α 5 crucial para la derivación de las células Isl1⁺. La laminina 511, la laminina 521 y una combinación de las dos inducen a las células madre mesenquimatosas (que pueden obtenerse de médula ósea de donantes humanos sanos, de sangre de cordón umbilical humano, de saco amniótico humano o de tejido cardíaco fetal o embrionario humano) a entrar en un linaje Isl1⁺ multipotente, mientras que otras lamininas son incapaces de promover la derivación de células Isl1⁺. Otras lamininas que comprenden una cadena α 5 (por ejemplo, las lamininas 522 y 523) también están naturalmente dentro del alcance de la presente invención.

Figura 9. Las lamininas 111 (una composición que comprende SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 y SEQ ID No. 6), 211 (una composición que comprende SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 2 y SEQ ID No. 6), 221 (una composición que comprende SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 5 y SEQ ID No. 6), y una combinación de las dos, promueven la diferenciación celular. La laminina 111, laminina 211, laminina 221, o cualquier combinación de las mismas, promueven la diferenciación de células Isl1⁺ en células cardíacas (por ejemplo cardiomiocitos, células del músculo liso y/o células endoteliales).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, entre otros a métodos para derivar células Isl1⁺ multipotentes (es decir, a métodos para inducir a una célula a entrar en un linaje Isl1⁺ multipotente), que comprende la etapa de cultivar una célula madre mesenquimatosa (MSC) (por ejemplo una célula procedente de una fracción de células mesenquimatosas) en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena α 5, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt. La célula Isl1⁺ obtenida usando dicho método puede cultivarse posteriormente en presencia de al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 221 y laminina 211, o cualquier combinación de las mismas, con el fin de diferenciar adicionalmente la población celular. Además, la presente invención se refiere a métodos para la autorrenovación y/o proliferación de células Isl1⁺ (que pueden obtenerse opcionalmente a través de los métodos de derivación según la presente invención pero el procedimiento de autorrenovación y/o mantenimiento también puede aplicarse a células Isl1⁺ obtenidas a través de otros métodos o de otras fuentes), que comprende las etapas de (i) cultivar una célula Isl1⁺ en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena α 5, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt; y, (ii) mantener y/o expandir las células que pueden obtenerse a partir de la etapa (i), en cultivo celular. La célula Isl1⁺ obtenida en la etapa (ii) del método de autorrenovación (proliferación) puede cultivarse posteriormente en presencia de al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y una combinación de las mismas, con el fin de diferenciar adicionalmente la población celular (en células cardíacas, específicamente cardiomiocitos).

En el presente documento se dan a conocer adicionalmente células que pueden obtenerse mediante los métodos según la presente invención, composiciones que comprenden al menos una laminina que comprende una cadena α 5 y al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, así como un kit (es decir, un kit de partes) que comprende al menos una laminina que comprende una cadena α 5 y un medio de cultivo celular que contiene al menos un

agente que activa la ruta canónica de Wnt (por ejemplo, en viales diferentes), o, alternativamente, un kit de diferenciación que comprende al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y una combinación de las mismas. Además, en el presente documento se dan a conocer células que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención para su uso en medicina, por ejemplo, en indicaciones relacionadas con cardiología, así como composiciones farmacéuticas que comprenden las células y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, con el fin de permitir la administración eficaz de las células al sitio/tejido diana. Finalmente, la presente invención se refiere además al uso de una combinación de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, para derivar una célula $Isl1^+$ multipotente (es decir, para inducir a una célula a entrar en un linaje $Isl1^+$ multipotente). De manera similar, la presente invención se refiere además al uso de (i) laminina 211, laminina 221, o una combinación de las mismas, y opcionalmente (ii) al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, para diferenciar una célula $Isl1^+$ multipotente en una célula cardíaca. El agente que activa la ruta canónica de Wnt puede incluirse en la etapa de diferenciación aunque su presencia no es absolutamente necesaria.

Cuando las características, realizaciones o aspectos de la presente invención se describen en términos de grupos de Markush, un experto en la técnica reconocerá que la invención también se describe por consiguiente en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush. El experto en la técnica reconocerá además que la invención también se describe por consiguiente en términos de cualquier combinación de miembros individuales o subgrupos de miembros de grupos de Markush. Adicionalmente, debe indicarse que las realizaciones y características descritas en relación con uno de los aspectos y/o realizaciones de la presente invención también se aplican, cambiando lo que se deba cambiar, al resto de aspectos y/o realizaciones de la invención. Por ejemplo, ha de entenderse que el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt descrito en relación con el método para derivar la células $Isl1^+$ multipotentes también es relevante para el kit de partes (denominado indistintamente el kit). Además, determinadas realizaciones descritas en relación con determinados aspectos, por ejemplo bromoindirubin-3'-oxima (BIO) tal como se describe en relación con el aspecto que se refiere al método para derivar la células $Isl1^+$ multipotentes, naturalmente también pueden ser relevantes en relación con otros aspectos y/o realización, en el caso de BIO, por ejemplo, en los aspectos/las realizaciones que se refieren a las composiciones o el kit de partes, según la presente invención.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para derivar células $Isl1^+$ multipotentes (es decir, un método para inducir a una célula a entrar en un linaje $Isl1^+$ multipotente), que comprende las etapas de (i) cultivar una célula mesenquimatosas (es decir, una célula procedente de una fracción de células mesenquimatosas) en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt (y continuar cultivando la célula durante un periodo de tiempo suficiente para derivar la célula $Isl1^+$ y/o para derivar poblaciones suficientes de células $Isl1^+$).

Debe entenderse que dentro del contexto de la presente invención el término "cultivar [...] en presencia de" puede interpretarse que engloba poner en contacto la célula/las células con por ejemplo al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y/o al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt. El tiempo de cultivo en presencia de por ejemplo el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt naturalmente puede ser de importancia para la presente invención, tal como se explica en mayor detalle a continuación. Normalmente, las lamininas usadas dentro del contexto de la presente invención se recubren sobre los equipos de cultivo celular/tisular, por ejemplo, una placa de cultivo celular o un stent que puede implantarse en el cuerpo humano o animal para un fin terapéutico, por ejemplo, para derivar células $Isl1^+$ y posteriormente diferenciar dichas células en cardiomiocitos, usando las etapas del método de la presente invención.

En una realización adicional según la presente invención, las células (madre) mesenquimatosas (por ejemplo, células procedentes de la fracción mesenquimatosas) pueden ser células cardíacas mesenquimatosas, células madre embrionarias, células madre de sangre de cordón umbilical y/o células madre amnióticas, o cualquier combinación de estas fuentes de células. Las células mesenquimatosas, también conocidas como células madre mesenquimatosas (MSC) son células estromales multipotentes que pueden diferenciarse en una variedad de tipos celulares incluyendo, pero sin limitarse a, osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Las MSC pueden derivarse de médula ósea, mesodermo, sangre de cordón umbilical, gelatina de Wharton, músculo de adulto, brotes dentales en desarrollo y/o líquido amniótico. Debe entenderse que las células procedentes de la "fracción mesenquimatosas", en el contexto de la presente invención, se refieren a células que pueden derivarse de cualquiera de las fuentes anteriores, por ejemplo, médula ósea, mesodermo, sangre de cordón umbilical, gelatina de Wharton, músculo de adulto, brotes dentales en desarrollo y/o líquido amniótico. El aspirado de médula ósea es una fuente adecuada para las células procedentes una fracción de células mesenquimatosas (es decir, células mesenquimatosas). El aspirado de médula ósea puede obtenerse introduciendo en la cresta ilíaca una aguja de aspiración, seguido por la extracción de un determinado volumen de aspirado que contiene células, que posteriormente puede clasificarse, cultivarse o congelarse para su uso futuro. Alternativamente, pueden extraerse y aislarse células de sangre de cordón umbilical o amnióticas para los fines de la presente invención. El aislamiento de dichas células puede llevarse a cabo en relación con el parto a través de técnicas convencionales.

Las MSC (es decir, las células procedentes de una fracción mesenquimatosas) que se emplean para tratar a un paciente pueden ser de origen alogénico, es decir, normalmente no es necesario usar células autólogas del paciente

que necesita tratamiento.

Los inventores se han dado cuenta inesperadamente de que usar al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ es altamente ventajoso y da como resultado la derivación sorprendentemente potenciada de las células $Isl1^+$ (figura 8). Cuando se usaron los métodos de cultivo de la presente invención, la expresión de $Isl1$, después de dos semanas en cultivo, se detectó de manera estable en más del 90% de la población de células mesenquimatosas, y después de 3 semanas de cultivo, la población celular se había expandido más de 1000 veces. La al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ puede seleccionarse del grupo que comprende laminina 511, laminina 521, una combinación de laminina 511 y laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética, que tenga al menos aproximadamente el 70% (preferiblemente al menos el 80% e incluso más preferiblemente al menos el 90%) de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda una secuencia polipeptídica, que tenga al menos aproximadamente el 70% (preferiblemente al menos el 80% e incluso más preferiblemente al menos el 90%) de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, y cualquier sustrato de crecimiento de cultivo celular o aditivo de medio de cultivo celular que comprenda polipéptidos de la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la laminina 521.

Además, según la presente invención, el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt puede seleccionarse del grupo que comprende Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-8, Wnt-8b, y cualquier combinación de las mismas. Los agentes adicionales que activan la ruta canónica de Wnt naturalmente también están dentro del alcance de la presente invención, independientemente de si la activación de la ruta canónica de Wnt se efectúa a través de activación directa de la ruta en cuestión (por ejemplo, mediada por Wnt-3a) o a través de estimulación indirecta de la ruta canónica de Wnt mediante el bloqueo de la ruta no canónica (por ejemplo, a través del bloqueo de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) que provoca la regulación por incremento de beta-catenina) (es decir, usando BIO). Además, pueden utilizarse diversos tipos de agentes dentro del alcance de la presente invención, tal como se explica en más detalle a continuación.

Los inventores se han dado cuenta de que seleccionar un intervalo de concentración apropiado del al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt es importante para la presente invención, de manera adecuada una concentración de aproximadamente 10-250 ng/ml, pero preferiblemente una concentración de aproximadamente 50-150 ng/ml, o incluso de manera más preferible de aproximadamente en torno a 100 ng/ml. Naturalmente, el intervalo de concentración depende de la actividad y la potencia del agente de activación de Wnt empleado en el caso específico. Cuando se utiliza BIO, o bien en combinación con por ejemplo un polipéptido de activación de Wnt (por ejemplo Wnt-3a) o bien solo, un intervalo de concentración adecuado puede ser de aproximadamente 0,1-5 mM, de manera preferible de aproximadamente 0,5-3 mM, o incluso de manera más preferible de aproximadamente 2,5 mM. Además, puede incluirse factor de crecimiento epidérmico (EGF), a una concentración que oscila entre 1 ng/ml y 100 ng/ml (preferiblemente de en torno a 10 ng/ml) en el medio de cultivo, con el fin de potenciar la expansión celular. Adicionalmente, cuando se usa medio DMEM/F12 para los métodos de cultivo celular, el medio puede complementarse con B27.

Una segunda etapa del método según la presente invención (es decir, la etapa (ii)) puede comprender además expandir la población de células $Isl1^+$, con el fin de aumentar el número de células. Adicionalmente, la segunda etapa puede comprender además la autorrenovación y/o proliferación de las células $Isl1^+$ (es decir, mantener las células $Isl1^+$ en cultivo de manera básicamente indefinida, para permitir el uso o la experimentación adicionales).

Con el fin de diferenciar adicionalmente las células que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención, puede incluirse una etapa adicional de diferenciación (iii), en la que las células $Isl1^+$ (o bien obtenidas a través de los métodos de derivación de la presente invención o bien células $Isl1^+$ que pueden obtenerse a partir de cualquier otra fuente) se cultivan en presencia de al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y cualquier combinación de las mismas. Cuando se cultivan las células en presencia de la al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y una combinación de las mismas, el agente de activación de Wnt puede excluirse del medio de cultivo, con el fin de potenciar adicionalmente la diferenciación al tipo celular deseado, en este caso células (y posiblemente tejidos) cardíacas (de corazón) (figura 9). La laminina 111 y otras lamininas que contienen $\alpha 1$ (tal como la laminina 121) pueden utilizarse en algunos casos también para derivar células $Isl1^+$ de células madre mesenquimatosas según la presente invención (además de su uso para diferenciar células $Isl1^+$ en células cardíacas), aunque la derivación usando lamininas que contienen $\alpha 5$ en general es significativamente más eficaz y fiable. Las lamininas que contienen $\alpha 1$ pueden estar presentes en una estructura tridimensional (tal como una matriz tridimensional y/o gel, por ejemplo Geltrex™), con el fin de inducir eficazmente la expresión de $Isl1^+$ (cuando se usa el mismo protocolo que se emplea para las lamininas que contienen $\alpha 5$).

La presente invención se refiere, al menos en parte, a métodos para la producción y expansión de progenitores $Isl1^+$, por ejemplo progenitores cardiovasculares, a la vez que mantienen su multipotencia y capacidad para la diferenciación en múltiples linajes. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de

autorrenovación de una célula Isl1⁺ multipotente, que comprende las etapas de (i) cultivar una células, que puede obtenerse a través de los métodos de derivación según la presente invención, en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt; y (ii) mantener y/o expandir las células que pueden obtenerse a partir de la etapa (i) en cultivo celular, esencialmente de manera indefinida.

Tal como se mencionó anteriormente, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para inducir a una célula a entrar en el linaje Isl1⁺. Más específicamente, la presente invención se basa en la constatación de que la activación de la señalización de Wnt en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ desencadena la entrada de células en el linaje islet 1⁺ y puede usarse para especificar previamente que las células se conviertan en progenitores Isl1⁺. Por tanto, la presente invención se refiere a métodos para inducir células, por ejemplo progenitores no comprometidos, en progenitores Isl1⁺, por ejemplo progenitores cardiovasculares Isl1⁺. Además, la presente invención proporciona métodos para expandir progenitores Isl1⁺ desencadenando su renovación.

Las células según la presente invención pueden ser células madre incluyendo, pero sin limitarse a, células madre embrionarias, células del cuerpo embrioide (EB), células madre adultas y células madre fetales posnatales, obtenidas opcionalmente de tejido, por ejemplo, tejido embrionario, fetal, postnatal o adulto. El tejido puede ser, por ejemplo, tejido cardíaco. Más específicamente, las células según la presente invención pueden ser células procedentes de una fracción mesenquimatosas (es decir, células mesenquimatosas, también conocidas como células madre mesenquimatosas), por ejemplo derivadas de médula ósea, mesodermo, sangre de cordón umbilical, gelatina de Wharton, músculo de adulto, brotes dentales en desarrollo y/o líquido amniótico.

El tejido puede comprender, pero sin limitarse a, fibroblastos, fibroblastos cardíacos, progenitores endoteliales circulantes, páncreas, hígado, tejido adiposo, médula ósea, riñón, vejiga, paladar, cordón umbilical, líquido amniótico, tejido dérmico, piel, músculo, bazo, placenta, hueso, tejido neural o tejido epitelial.

Las células pueden obtenerse adicionalmente de un sujeto con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, de un sujeto con una disfunción, enfermedad o trastorno cardíaco o cardiovascular, adquirido o congénito, por ejemplo un defecto cardíaco. La célula puede ser de origen mamífero, por ejemplo, ser humano, y también puede ser una célula modificada genéticamente. Adicionalmente, las células madre mesenquimatosas también pueden obtenerse de un donante sano joven (preferiblemente menor de 35 años de edad), por ejemplo, a través de aspiración de células (por ejemplo en torno a 50 ml) de la médula ósea.

La presente invención también se refiere a métodos para expandir progenitores Isl1⁺ (es decir, progenitores que ya son Isl1⁺) mediante la activación o potenciación de la ruta de Wnt/ β -catenina. En particular, la presente invención se basa en el descubrimiento de que la activación, el aumento o la potenciación de la señalización de Wnt cuando las células se cultivan en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ desencadena la renovación de progenitores Isl1⁺ y puede usarse para expandir los progenitores Isl1⁺ mientras se mantiene su capacidad para la diferenciación en múltiples linajes. Por consiguiente, la presente invención se refiere a métodos para expandir progenitores Isl1⁺, por ejemplo progenitores cardiovasculares Isl1⁺. La activación, el aumento o la potenciación de la ruta canónica de Wnt se efectúa mediante al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt. En este contexto, los agentes que activan la ruta canónica de Wnt son cualesquiera agentes que activan la ruta canónica de Wnt. Preferiblemente, tal(es) agente(s) activa(n) la ruta canónica de Wnt de manera selectiva. En algunas realizaciones, los agentes que activan la ruta canónica de Wnt se aplican directamente al progenitor Isl1⁺, por ejemplo, los agentes que activan la ruta canónica de Wnt se aplican a los medios de cultivo.

En el presente documento se dan a conocer células que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención, es decir, células Isl1⁺, de manera opcional diferenciadas adicionalmente en, por ejemplo, células cardíacas, por ejemplo, cardiomiocitos (las células diferenciadas usando los métodos de la presente invención normalmente muestran un aumento de al menos 100 veces en la expresión de troponina T, y frecuentemente un aumento de 150 veces en la expresión). Las células según la presente invención pueden crioseguardarse opcionalmente, con el fin de permitir el almacenamiento, la manipulación facilitada y el uso y la experimentación posteriores.

También se da a conocer en el presente documento una composición que comprende al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt. La al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ puede seleccionarse del grupo que comprende laminina 51, laminina 521, una combinación de laminina 511 y laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética, que tenga al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda una secuencia polipeptídica, que tenga al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, y cualquier sustrato de crecimiento de cultivo celular o aditivo de medio de cultivo celular que comprenda polipéptidos de la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la

laminina 521.

Además, según la presente invención, el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, y que está comprendido en la composición, puede seleccionarse del grupo que comprende Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-8, Wnt-8b, y cualquier combinación de las mismas. Los agentes adicionales que activan la ruta canónica de Wnt naturalmente también están dentro del alcance de la presente invención, independientemente de si la activación de la ruta canónica de Wnt se efectúa a través de activación directa de la ruta en cuestión (por ejemplo, mediada por Wnt-3a) o a través de estimulación indirecta de la ruta canónica de Wnt. La composición puede estar presente en varias formas diferentes, por ejemplo seleccionadas del grupo que comprende un líquido, un sólido, una matriz, una dispersión, una suspensión, una emulsión, una microemulsión, un gel o una disolución, y cualquier combinación de las mismas. La composición dada a conocer en el presente documento puede ser por ejemplo una combinación de un líquido (que comprende preferiblemente el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt) y sustancialmente un sólido y/o un gel y/o una matriz (que comprende preferiblemente la laminina que comprende una cadena $\alpha 5$).

También se da a conocer en el presente documento un kit (es decir, un kit de partes) que comprende al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y un medio de cultivo celular que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt. Los componentes del kit (es decir, la laminina y el agente de activación de Wnt) pueden proporcionarse ventajosamente en recipientes independientes (por ejemplo, viales, ampollas, tubos o similares), con el fin de permitir combinar los componentes cuando se llevan a cabo los métodos según la presente invención. El kit puede comprender por ejemplo un medio de cultivo celular que comprende el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt (a una concentración adecuada), y la al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, recubierta por ejemplo sobre una superficie adecuada para cultivo celular (tal como una placa de cultivo celular, un pocillo de una placa de múltiples pocillos, una placa Petri, un frasco de cultivo celular, etc.). Además, el kit también puede comprender componentes adicionales para diferenciar las células $Isl1^{+}$ en células cardíacas (por ejemplo, cardiomiocitos), concretamente al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y cualquier combinación de las mismas. Un kit de derivación y diferenciación adecuado según la presente invención comprendería por tanto un medio de cultivo celular que comprende el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, un medio de diferenciación de cultivo celular que puede carecer del al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, y al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y cualquier combinación de las mismas. En un caso, la laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ puede recubrirse sobre un 1^{er} conjunto de equipos de cultivo celular, mientras que la al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y cualquier combinación de las mismas, se recubre sobre un 2^o conjunto de equipos de cultivo celular, y donde se proporciona un medio de cultivo celular que comprende el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt en un recipiente mientras que se proporciona el medio de diferenciación de cultivo celular que carece del agente/de los agentes de activación de Wnt en otro recipiente.

Adicionalmente, stents u otros dispositivos médicos para su implantación en un cuerpo humano o animal también pueden recubrirse con combinaciones adecuadas de o bien la laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ o bien la al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y cualquier combinación de las mismas, para permitir la derivación y/o diferenciación de cardiomiocitos dentro del cuerpo humano o animal. El stent puede comprender oro, cobalto-cromo, tantalito, nitinol, silicona, polietileno y/o poliuretano o cualquier combinación de los mismos. Los stents en cuestión pueden ser, por ejemplo, un stent coronario, un stent de derivación de vaso sanguíneo y/o un stent traqueal. El stent puede ser un stent de elución de fármaco, en el que el fármaco que va a eluirse puede ser, por ejemplo, un agente de activación de Wnt, un agente para vascularización, un agente de inmodulación o cualquier/cualesquiera otro(s) agente(s) adecuado(s) para optimizar el injerto y la función del stent. Los stents pueden implantarse con o sin células, por ejemplo, células $Isl1^{+}$ o células $Isl1^{+}$ que se han diferenciado adicionalmente en células cardíacas (por ejemplo, cardiomiocitos o células endoteliales cardíacas o del músculo liso).

La al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ puede seleccionarse del grupo que comprende laminina 511, laminina 521, una combinación de laminina 511 y laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética, que tenga al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda una secuencia polipeptídica, que tenga al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, y cualquier sustrato de crecimiento de cultivo celular o aditivo de medio de cultivo celular que comprenda polipéptidos de la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la laminina 521. Además, según la divulgación en el presente documento, el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, y que está comprendido en la composición, puede seleccionarse del grupo que comprende Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-8, Wnt-8b, y cualquier combinación de las mismas.

En otro aspecto, en el presente documento se dan a conocer células tal como se describe en el presente documento para su uso en medicina. Más específicamente, las células pueden usarse en el tratamiento y/o la profilaxis de

insuficiencia cardiaca, fallo cardiaco, infarto de miocardio y/o enfermedad cardiaca congénita debido a defectos cardiacos que afectan a partes derivadas del segundo campo cardiaco (por ejemplo, aurícula derecha, ventrículo derecho, infundíbulos (aorta, arterias pulmonares) y tabique interventricular). Además, también se dan a conocer en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden células según la invención, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en medicina, por ejemplo, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de insuficiencia cardiaca, fallo cardiaco, infarto de miocardio y/o enfermedad cardiaca congénita debido a defectos cardiacos que afectan a partes derivadas del segundo campo cardiaco (por ejemplo aurícula derecha, ventrículo derecho, infundíbulos (aorta, arterias pulmonares) y tabique interventricular). Tanto las células $Isl1^+$, derivadas a través de los métodos de derivación de la presente invención (es decir, a través del cultivo de una célula mesenquimatosas en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt), como las células que se han diferenciado adicionalmente usando los métodos de diferenciación de la presente invención (es decir, a través del cultivo en presencia de al menos una de laminina 111, laminina 211, laminina 221, o cualquier combinación de las mismas) pueden incluirse en una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de diversas enfermedades y dolencias. La composición farmacéutica puede comprender al menos 100.000 (1×10^5) células por ml, preferiblemente al menos 500.000 (5×10^5) por ml, en un portador farmacéuticamente aceptable, normalmente una disolución acuosa que comprende NaCl en torno al 9%.

Además, preferiblemente pueden usarse al menos 100.000 células por kg de peso corporal, preferiblemente al menos 500.000 por kg de peso corporal, o incluso más preferiblemente al menos 1.000.000 de MSC por kg de peso corporal.

También se dan a conocer en el presente documento métodos de tratamiento para mejorar, aliviar o prevenir insuficiencia cardiaca, fallo cardiaco, infarto de miocardio y/o enfermedad cardiaca congénita debido a defectos cardiacos que afectan a partes derivadas del segundo campo cardiaco (por ejemplo aurícula derecha, ventrículo derecho, infundíbulos (aorta, arterias pulmonares) y tabique interventricular) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las células según la presente invención. El sujeto es preferiblemente un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Las células pueden administrarse a través de administración intravascular, administración intravenosa, administración intraventricular, administración epicárdica, administración intramuscular, administración intraportal, administración intratecal y/o administración subcutánea, o a través de cualquier otro método de administración adecuado que administre las células al sitio/tejido diana. Específicamente, en el contexto del infarto de miocardio, las células pueden administrarse ventajosamente a un paciente a través de inyección/infusión endovascular o a través de administración percutánea en el vaso ocluido (antes o después de la reapertura), usando un catéter. Adicionalmente, para el tratamiento de la disfunción del nódulo sinusal, las células $Isl1^+$ (opcionalmente diferenciadas en cardiomiocitos, en este caso células intersticiales) pueden administrarse a un paciente a través de administración percutánea usando un catéter introducido en la aurícula derecha, preferiblemente a través del seno coronario.

Alternativamente, las células tal como se describe en el presente documento (o bien células $Isl1^+$ o bien células $Isl1^+$ diferenciadas adicionalmente en cardiomiocitos) pueden administrarse al paciente a través de la introducción de un stent adecuado (por ejemplo, un stent coronario que se introduce en relación con el procedimiento de tratamiento).

Además, puede aplicarse la administración *in utero* de células para tratar defectos cardiacos fetales.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una combinación de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, para derivar una célula $Isl1^+$ multipotente (es decir, para inducir a una célula a entrar en un linaje $Isl1^+$ multipotente). La al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ puede seleccionarse del grupo que comprende laminina 511, laminina 521, una combinación de laminina 511 y laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética, que tenga al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la laminina 521, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, cualquier proteína natural, recombinante o sintética que comprenda una secuencia polipeptídica, que tenga al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica del dominio G de la cadena $\alpha 5$ de laminina, y cualquier sustrato de crecimiento de cultivo celular o aditivo de medio de cultivo celular que comprenda polipéptidos de la secuencia polipeptídica de la laminina 511 o la laminina 521. Además, según la presente invención, el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, y que está comprendido en la composición, puede seleccionarse del grupo que comprende Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-8, Wnt-8b, y cualquier combinación de las mismas.

También se dan a conocer métodos que usan los progenitores $Isl1^+$ generados y expandidos mediante los métodos descritos en el presente documento. En una realización, los progenitores $Isl1^+$ generados y expandidos mediante los métodos descritos en el presente documento se usan para la producción de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición para medicina regenerativa. Adicionalmente, las células $Isl1^+$ que se han diferenciado en cardiomiocitos también pueden usarse en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, para el tratamiento de diversas enfermedades y dolencias relacionadas con cardiología. Las composiciones pueden ser para su uso en

trasplante en sujetos que necesitan trasplante cardiaco, por ejemplo pero sin limitarse a sujetos con enfermedad cardiaca congénita y/o adquirida y/o sujetos con enfermedades vasculares y/o enfermedades cardiovasculares.

Los sujetos pueden tener o estar en riesgo de tener una enfermedad cardiaca y/o enfermedad vascular y/o enfermedad cardiovascular, y los progenitores $Isl1^+$ generados y expandidos mediante los métodos de la presente invención pueden ser autólogos y/o alogénicos (y las células, de manera opcional, pueden estar modificadas genéticamente).

Los progenitores $Isl1^+$ y las células cardiacas diferenciadas adicionalmente generadas y expandidas mediante los métodos de la presente invención pueden usarse en ensayos y experimentos, por ejemplo, para detectar agentes, por ejemplo, agentes para el desarrollo de intervenciones terapéuticas de enfermedades incluyendo, pero sin limitarse a, agentes terapéuticos para la insuficiencia cardiaca congénita y de adulto. Alternativamente, las células tal como se describen en el presente documento pueden emplearse en ensayos para detectar agentes que son tóxicos para la célula (por ejemplo, pruebas de cardiotoxicidad).

Por tanto, la presente invención proporciona métodos para; (i) desencadenar o inducir que células, normalmente células madre mesenquimatosas, entren en la ruta de linaje $Isl1^+$ mediante la activación de la ruta canónica de Wnt (es decir, un método para derivar una célula $Isl1^+$) y cultivar en presencia de laminina(s) que tiene(n) determinadas características, (ii) expandir las células $Isl1^+$, por ejemplo, cualquier progenitor $Isl1^+$ de la jerarquía progenitora cardiovascular $Isl1^+$, mediante la renovación continua de las células así obtenidas, y (iii) diferenciar dichas células $Isl1^+$ en, por ejemplo, células cardiacas, tales como cardiomiocitos, células del músculo liso y/o células endoteliales.

Se entenderá que el al menos un agente que activa, aumenta o potencia la ruta canónica de Wnt, en el presente documento denominado alternativamente "agente que activa la ruta canónica de Wnt" o "agentes de activación" comprende agentes que activan la ruta canónica de Wnt directa o indirectamente.

Por motivos de conveniencia y claridad, a continuación se recopilan determinados términos empleados en el presente documento. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "laminina" se refiere a una familia de glucoproteínas heterotriméricas compuestas por las cadenas α , β y γ que existen, respectivamente, como cinco, tres, y tres tipos genéticamente distintos que forman 15 combinaciones diferentes en tejidos humanos. Se nombran según la composición de cadenas; por ejemplo, la laminina 511 (LN-511) consiste en las cadenas $\alpha5$, $\beta1$ y $\gamma1$. Anteriormente, las lamininas se denominaban según el orden de su descubrimiento. Por tanto, la laminina 111 se denominó laminina 1; la laminina 511 se denominó laminina 10; la laminina 521 se denominó laminina 11.

Las lamininas son el componente principal de las membranas basales y están en contacto con diversas células *in vivo* y diferentes lamininas muestran diversos patrones de expresión espacio-temporales en organismos en desarrollo, así como ubicación y funciones específicas de tejido. Por tanto, la laminina 211 y la laminina 221 están presentes principalmente en membranas basales en torno a las células musculares y sinapsis de neuronas motoras, la laminina 332 es específica para membranas basales subepiteliales, y la laminina 511 es prácticamente ubicua. La primera laminina descubierta, la laminina 111, que también se conoce como laminina 1 o simplemente laminina, está restringida al embrión temprano y es una isoforma muy posterior en tejidos humanos adultos. La laminina 111 se ha estudiado más ampliamente, porque es posible aislarla del sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón, que es fácil de inducir. Otras lamininas son difíciles de aislar de los tejidos debido a la amplia reticulación y preferiblemente se expresan como proteínas recombinantes en células de mamífero.

Los efectos celulares de las lamininas están mediados en gran medida mediante unión de ligando a receptores de la membrana celular, tales como integrinas, distroglicano y glucoproteína luterana. Pueden inducir una señalización directa de afuera hacia adentro en las células, lo que se ha demostrado que altera los niveles de transcripción de genes e incluso influye en la remodelación de la cromatina de los promotores génicos. Las lamininas son muy diferentes en su especificidad de ligando. Por tanto, las lamininas que contienen una cadena $\alpha5$ pueden unirse con avidéz a la integrina $\alpha6\beta1$, la integrina $\alpha3\beta1$ y la glucoproteína luterana, mientras que la laminina 111 (o laminina) tiene la mayor afinidad por la integrina $\alpha7X2\beta1$ y el distroglicano. Las cadenas β y γ de laminina pueden modular la unión de laminina-integrina, pero la interacción celular está mediada principalmente por la unión de las cadenas α a los receptores. Por tanto, las lamininas que contienen $\alpha5$ deben considerarse diferentes de, por ejemplo, las lamininas que contienen $\alpha2$.

Por tanto, el término "laminina que comprende una cadena $\alpha5$ " usado en el presente documento se refiere a cualquier polipéptido de laminina que comprende una cadena α de tipo cinco (5), por ejemplo, laminina 511, 521, 522, 523, etc. Lamininas adicionales que comprenden una cadena $\alpha5$ naturalmente también están dentro del alcance de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, una cadena $\alpha5$ se refiere a cualquier cadena polipeptídica que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la cadena $\alpha5$ de laminina, por

ejemplo de SEQ ID No. 1, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 80%, e incluso más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 90%. Más generalmente, todos los polipéptidos y/o nucleótidos dados a conocer en la presente solicitud engloban secuencias de polipéptidos y/o nucleótidos que tienen al menos el 70% de identidad de secuencia con el polipéptido y/o nucleótido en cuestión, preferiblemente una

El término “célula Isl1⁺” se refiere a células que en circunstancias normales pueden expresar los siguientes marcadores (además de Isl1); marcadores mesodérmicos; Tbx6 y Brachyury T; C-Kit; marcadores de activación de cardiogénesis temprana: GATA4, Mef2c, Nkx2.5; marcadores de multipotencia, tales como Sox2, SSEA1, Nanog, Tra-1, KDR o una combinación de estos; factores de transcripción implicados en la red transcripcional del segundo campo cardiaco: Tbx1, Hand2, FoxH1; otros factores relevantes vinculados a la expresión de Isl1 como Fgf8 y 10.

El término “célula cardiaca” o “célula de corazón” o “cardiomiocito” se entenderá como una célula que, en circunstancias normales, puede expresar marcadores tales como: cadenas pesadas de miosina (MyH), troponina T (TnT) y/o troponina I (TnI) y las proteínas se organizan normalmente en elementos contráctiles.

Debe entenderse que el término “células progenitoras” o “progenitores” se refiere a células que tienen un fenotipo celular que es más primitivo (es decir, se encuentra en un estadio más temprano a lo largo de una ruta o progresión de desarrollo que en una célula completamente diferenciada) en relación con un célula a la que puede dar lugar por diferenciación. Las células progenitoras también tienen con frecuencia un potencial proliferativo significativo o muy alto, y pueden dar lugar a múltiples tipos distintos de células diferenciadas o a un sólo tipo de células diferenciadas, dependiendo de la ruta de desarrollo y del entorno circundante en el que las células se desarrollan y se diferencian. Una célula puede comenzar como célula progenitora y avanzar hacia un fenotipo diferenciado, pero luego puede revertir y volver a expresar el fenotipo de la célula progenitora. En consecuencia, una célula progenitora puede derivarse de una célula no madre.

Debe entenderse que el término “célula madre” se refiere a una célula indiferenciada que puede proliferar y dar lugar a más células progenitoras que tienen capacidad de generar un gran número de células madre que a su vez pueden dar lugar a células diferenciadas o células hijas que pueden diferenciarse. Las propias células hijas pueden inducirse a proliferar y producir progenie que posteriormente se diferencian en uno o más tipos de células maduras, mientras que al mismo tiempo retienen una o más células con potencial de desarrollo parental. La expresión “célula madre” se refiere a un subconjunto de progenitores que tienen capacidad o potencial, en circunstancias particulares, de diferenciarse en un fenotipo más especializado o diferenciado, y que conserva la capacidad, en determinadas circunstancias, de proliferar sin diferenciarse sustancialmente. El término “célula madre” generalmente puede referirse a una célula madre que se produce de manera natural cuyos descendientes (progenie) se especializan, a menudo en diferentes direcciones, mediante diferenciación, por ejemplo, mediante la adquisición de caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y/o tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que normalmente se produce a través de muchas divisiones celulares y una célula diferenciada puede derivarse de una célula multipotente que por sí misma se deriva de una célula multipotente, etc. Aunque cada una de estas células multipotentes puede considerarse células madre, la diversidad de los tipos de células a los que puede dar lugar cada una puede variar sustancialmente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo y tal capacidad puede inducirse artificialmente tras el tratamiento con diversos factores, o puede ser natural. Las células madre también son en muchos casos “multipotentes” porque pueden producir progenie de más de un tipo de célula distinto, pero esto no es necesario para su capacidad como células madre (*stemness*). La autorrenovación es la otra parte típica de la definición de células madre, y es importante para los fines de esta invención. Teóricamente, la autorrenovación puede producirse mediante cualquiera de los dos mecanismos principales, es decir, de manera simétrica o asimétrica. La división asimétrica se refiere a que una hija retiene el estado de célula madre y la otra hija expresa alguna otra función y fenotipo específicos distintos. La división simétrica se refiere al proceso cuando algunas de las células madre en una población se dividen simétricamente en dos ramas, manteniendo así algunas células madre en la población como un todo, mientras que otras células en la población dan lugar solamente a una progenie diferenciada. Formalmente es posible que las células que comienzan como células madre avancen hacia un fenotipo diferenciado, pero luego revierten y vuelven a expresar el fenotipo de la célula madre, un proceso que a menudo se denomina, por ejemplo, “desdiferenciación” o “reprogramación” o “retrodiferenciación”.

Debe entenderse que el término “diferenciación” en el presente contexto significa la formación de células que expresan marcadores o características que se sabe que están asociadas con células que están más especializadas y más cerca de convertirse en células diferenciadas terminalmente, que no pueden realizar división o diferenciación adicional. La diferenciación progresiva o compromiso progresivo se refiere a la ruta a lo largo de la cual las células progresan desde una célula menos comprometida, a una célula que está cada vez más comprometida con un tipo de célula en particular, y en última instancia a una célula que está diferenciada terminalmente. Las células que están más especializadas (por ejemplo, han comenzado a progresar a lo largo de una ruta de diferenciación progresiva) pero aún no se han diferenciado terminalmente se denominan parcialmente diferenciadas. La diferenciación es un proceso de desarrollo mediante el cual las células adquieren un fenotipo especializado (por ejemplo, adquieren una o más características, rasgos distintivos o funciones distintos de otros tipos de células). En determinados casos, el

fenotipo diferenciado puede referirse a un fenotipo celular que se encuentra en el punto final maduro en alguna ruta de desarrollo (la denominada célula terminalmente diferenciada). En muchos (pero no en todos) los tejidos, el proceso de diferenciación está relacionado con la salida del ciclo celular y, en estos casos, las células diferenciadas terminalmente pierden o restringen en gran medida su capacidad de proliferar. Para los fines de la presente invención, debe entenderse que el término “diferenciación” o “diferenciado” se refiere a células que están más especializadas en su destino y/o función que en un punto anterior de su desarrollo, incluyendo por consiguiente tanto células que están terminalmente diferenciadas como células que (aunque no están terminalmente diferenciadas) son más especializadas que en un punto anterior de su desarrollo.

En el contexto de los orígenes y el desarrollo de las células (es decir, la ontogenia celular), “diferenciado” o “de diferenciación” es un término relativo que significa que una “célula diferenciada” es una célula que ha avanzado más en una ruta de desarrollo que la célula con la que está comparándose. Por tanto, las células madre pueden diferenciarse en células precursoras restringidas a un determinado linaje (tal como por ejemplo, una célula madre mesodérmica), que a su vez puede diferenciarse en otros tipos de células precursoras más avanzadas en la ruta en cuestión (tal como un precursor de cardiomiocitos), y luego en una célula terminalmente diferenciada (que puede desempeñar un papel característico en un determinado tipo de tejido, y puede o no (dependiendo de las circunstancias) retener la capacidad de proliferar adicionalmente.

Debe entenderse que el término “célula madre embrionaria” se refiere a las células madre pluripotentes que también pueden obtenerse a partir de la masa celular interna de blastocistos. Las características distintivas de una célula madre embrionaria definen un fenotipo de célula madre embrionaria. En consecuencia, una célula tiene el fenotipo de una célula madre embrionaria si posee una o más de las características/rasgos distintivos únicos de una célula madre embrionaria, de modo que la célula puede distinguirse de otras células. Las características/rasgos distintivos de las células madre embrionarias a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, capacidad proliferativa, perfil de expresión génica, cariotipo, capacidad de diferenciación, capacidad de respuesta a condiciones de cultivo particulares, así como posibles características/rasgos distintivos adicionales.

El término “célula madre adulta” o “ASC” se usa para referirse a cualquier célula madre multipotente derivada de tejido no embrionario, incluyendo tejido fetal, juvenil y adulto. Se han aislado células madre de una amplia variedad de tejidos adultos incluyendo sangre, médula ósea, cerebro, epitelio olfativo, piel, páncreas, músculo esquelético y músculo cardíaco. Los ejemplos de células madre adultas incluyen, pero no se limitan a, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células madre neurales, células madre de la cresta neural y células madre pancreáticas. Tal como se indicó anteriormente, se ha encontrado que las células madre residen básicamente en todos los tipos de tejido y dentro del contexto de la presente invención, por tanto, pueden aislarse poblaciones de células madre prácticamente de cualquier tejido animal.

Debe entenderse que los términos “proliferar” y “proliferación” se refieren a un aumento en el número de células en una población (crecimiento) mediante división celular. En general se entiende que la proliferación celular es una implicación de la activación coordinada de múltiples rutas de transducción de señales (en respuesta al entorno que rodea a una célula), incluyendo factores de crecimiento y otros mitógenos. La proliferación celular también puede promoverse mediante la liberación de acciones negativas o de bloqueo de mecanismos y señales intracelulares y/o extracelulares.

Los términos “renovación” o “autorrenovación” o “proliferación” se usan indistintamente en el presente documento, y debe entenderse que se refieren a la capacidad de las células madre para renovarse por sí mismas dividiéndose en el mismo tipo de célula no especializada durante largos períodos, por ejemplo, de muchos meses a años. La proliferación puede referirse en algunos casos a la expansión de las células mediante la división repetida de una sola célula en dos células hijas idénticas.

El término “embrionario” puede usarse, dentro del contexto de la presente invención, para referirse a material fetal (es decir, células o tejidos), es decir, células/tejidos que pueden obtenerse de un feto en desarrollo. Por definición, un embrión entra en el estadio fetal (es decir, se convierte en un feto) en el momento de la organogénesis (es decir, cuando los órganos comienzan a formarse) y los tejidos y células usados en determinados ejemplos según la presente invención se obtienen a partir de material fetal, es decir, a partir de la semana gestacional 6-10. Normalmente, la definición en seres humanos es que el período embrionario se extiende desde la fecundación hasta las ocho semanas después de la fecundación, mientras que el período que comienza desde las ocho semanas y que dura hasta el parto se define como el período fetal. Esencialmente, dentro del contexto de la presente invención, cuando se utilizan células y/o tejidos prenatales, normalmente son de carácter fetal, pero a veces también de carácter embrionario.

Los términos “célula mesenquimatosa” o “mesénquima” o “células procedentes de una fracción mesenquimatosa” o “células madre mesenquimatosas” o “MSC” se usan indistintamente en el presente documento y pueden referirse, para los fines de la presente invención, en algunos casos, a las células fusiformes o estrelladas que se encuentran entre el ectodermo y el endodermo de embriones jóvenes, o células que se encuentran en tejido adulto, tal como médula ósea, mesodermo, sangre de cordón umbilical, gelatina de Wharton, músculo de adulto, brotes dentales en desarrollo y/o líquido amniótico. La mayoría de las células mesenquimatosas se derivan de capas mesodérmicas

establecidas, pero también pueden desarrollarse a partir del ectodermo de la cresta neural o el tubo neural en la región cefálica. Debe entenderse que una “célula madre mesenquimatosa” o una “célula mesenquimatosa” se refiere a una célula procedente de cualquier tejido adulto adecuado, tal como médula ósea, mesodermo, sangre de cordón umbilical, gelatina de Wharton, músculo de adulto, brotes dentales en desarrollo y/o líquido amniótico, o procedente de tejido conjuntivo fetal o embrionario. Además, pueden usarse células madre pluripotentes inducidas (es decir, células iPS), que pueden derivarse de, por ejemplo, un fibroblasto humano, un hepatocito humano y/o una célula sanguínea humana, en el contexto de la presente invención, para derivar células $Isl1^{+}$. Además, los progenitores mesenquimatosos o progenitores mesodérmicos pueden denominarse células progenitoras de origen mesodérmico. El mesodermo es la capa germinativa embrionaria media, situada entre el ectodermo y el endodermo, a partir de la cual se desarrollan tejido conjuntivo, músculo, hueso y los aparatos genitourinario y circulatorio. Debe entenderse, dentro del contexto de la presente invención, que una célula procedente de la “fracción mesenquimatosa” se refiere a cualquier tipo de célula mesenquimatosa (es decir, una célula madre mesenquimatosa (MSC)) que puede derivarse por ejemplo de cualquiera de las siguientes fuentes: médula ósea, mesodermo, sangre de cordón umbilical, gelatina de Wharton, músculo de adulto, brotes dentales en desarrollo y/o líquido amniótico. Las MSC según la presente invención pueden obtenerse, por ejemplo, mediante aspiración de la médula ósea, o mediante aislamiento de sangre de cordón umbilical, o pueden extraerse del mesodermo de un feto y/o un embrión.

Debe entenderse que el término “linajes”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula con una ascendencia común o células con un destino de desarrollo común. Debe entenderse que una célula que ha entrado en un “linaje de islet 1⁺” se refiere a la célula que es un progenitor $Isl1^{+}$ y que expresa $Isl1^{+}$, y que puede diferenciarse a lo largo de las rutas restringidas del linaje del progenitor $Isl1^{+}$. Tales rutas pueden ser una o más rutas de linaje del desarrollo, por ejemplo, un linaje endotelial, un linaje cardíaco o un linaje de músculo liso. Por ejemplo, una célula que ha entrado en el linaje $Isl1^{+}$ es una célula que tiene capacidad de diferenciarse en tres tipos de células principales en el corazón (es decir, células cardíacas, de músculo liso y endoteliales).

Debe entenderse que un “marcador” describe las características/rasgos distintivos y/o el fenotipo de una célula y los marcadores a menudo pueden usarse para la selección/identificación de células que comprenden características de interés. Los marcadores variarán con las células específicas. Los marcadores son características, ya sean características morfológicas, funcionales o bioquímicas (enzimáticas) de la célula de un tipo celular particular, o moléculas expresadas por el tipo celular. Los marcadores son preferiblemente proteínas y más preferiblemente poseen al menos un epítipo para anticuerpos u otras moléculas de unión que pueden estar disponibles. Sin embargo, un marcador puede ser cualquier molécula encontrada en una célula incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas (péptidos y polipéptidos), polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y esteroides. Algunos ejemplos de características/rasgos distintivos o caracteres morfológicos incluyen, por ejemplo, forma, tamaño y razón de núcleo con respecto a citoplasma. Los ejemplos de características o rasgos distintivos funcionales comprenden, por ejemplo, la capacidad de migrar en determinadas condiciones, la capacidad de adherirse a determinados sustratos y la capacidad para diferenciarse a lo largo de linajes particulares.

Los términos “sujeto” e “individuo” y “paciente” pueden usarse indistintamente en el presente documento y debe entenderse que se refieren a un animal, por ejemplo un ser humano, a partir del cual pueden obtenerse células y/o a quién se le proporciona tratamiento, incluyendo profilaxis o tratamiento preventivo (por ejemplo, usando las células según la presente invención). Ventajosamente, el sujeto de los tratamientos tal como se describe en el contexto de la presente invención es un mamífero, preferiblemente un ser humano, u otros mamíferos, preferiblemente mamíferos domesticados o de producción.

Debe entenderse que las enfermedades, estados o trastornos cardiovasculares comprenden estados médicos relacionados con el aparato cardiovascular (corazón) o circulatorio (vasos sanguíneos). Una respuesta a la lesión miocárdica sigue una ruta claramente definida en la que algunas células mueren mientras que otras entran en un estado de hibernación (en el que aún no están muertas pero son disfuncionales). Esto va seguido por infiltración de células inflamatorias y deposición de colágeno como parte de un proceso de cicatrización. Esto sucede en paralelo con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y un determinado grado de muerte celular continua. Se pretende que el término enfermedades cardiovasculares comprenda todos los trastornos y enfermedades caracterizados por función cardíaca insuficiente, no deseada o anómala, por ejemplo, cardiopatía congénita y cualquier estado que conduzca a insuficiencia cardíaca congestiva en un sujeto, particularmente un sujeto humano, cardiopatía isquémica, enfermedad cardíaca hipertensiva y enfermedad cardíaca hipertensiva pulmonar y enfermedad valvular. La función cardíaca insuficiente o anómala puede implicar una enfermedad, lesión, traumatismo y/o envejecimiento, que comprende, por ejemplo, enfermedades y/o trastornos del pericardio, válvulas cardíacas (por ejemplo, válvulas estenosadas, válvulas insuficientes, enfermedad cardíaca reumática, regurgitación aórtica, prolapsos de la válvula mitral), miocardio (infarto de miocardio, arteriopatía coronaria, insuficiencia cardíaca, angina, cardiopatía isquémica), vasos sanguíneos (por ejemplo, arteriosclerosis o aneurisma) o venas (por ejemplo, venas varicosas, hemorroides). Debe entenderse que el término “isquemia” se refiere a cualquier isquemia tisular localizada debido a la reducción del flujo de entrada de sangre, y debe entenderse que el término “isquemia miocárdica” comprende trastornos circulatorios provocados por aterosclerosis coronaria y/o aporte inadecuado de oxígeno al miocardio. Un infarto agudo de miocardio puede representar una lesión isquémica irreversible al tejido miocárdico. Esta lesión puede dar como resultado un acontecimiento oclusivo (por ejemplo, trombótico o embólico) en la circulación coronaria, produciendo un entorno en el que las demandas metabólicas del miocardio están superando el aporte de oxígeno al

tejido miocárdico.

El término “agente” se refiere a cualquier sustancia química, entidad o resto, que comprende por ejemplo (sin limitación) entidades proteicas y no proteicas, sintéticas y que se producen en la naturaleza. Un agente puede ser un ácido nucleico, análogos de ácido nucleico, péptidos, proteínas, anticuerpos, aptámeros, oligómeros de aminoácidos, ácidos nucleicos o hidratos de carbono que comprenden, por ejemplo, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, glucoproteínas, proteínas, ARNip, lipoproteínas, aptámeros y cualquier modificación y combinaciones de los mismos. También debe entenderse que los agentes incluyen posiblemente moléculas pequeñas que tienen determinados restos químicos, que comprenden, por ejemplo, restos químicos tales como restos alquilo, aromáticos o heterociclilo, no sustituidos o sustituidos, que incluyen macrólidos, leptomicinas y productos naturales relacionados o análogos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de activación de Wnt” se refiere a cualquier agente que active la ruta canónica de Wnt, o inhiba o suprima la actividad de los inhibidores de la ruta canónica de Wnt. La activación es preferiblemente activación selectiva, lo que significa que la ruta de Wnt3 se activa con la exclusión sustancial de los efectos (es decir, la activación de la inhibición) en rutas distintas de Wnt3.

Debe entenderse que el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que da como resultado una mejora, alivio o remedio de la enfermedad, el trastorno o los síntomas de la enfermedad o el estado.

Los términos “administrar”, “introducir” y “trasplantar” se usan indistintamente para los fines de la presente invención, por ejemplo en el contexto de la colocación de progenitores $Isl1^+$ (por ejemplo, células $Isl1^+$ o cardiomiocitos que expresan troponina T diferenciados usando los métodos de la presente invención) en un sujeto. Una vía o método adecuado es uno que conduce a una localización al menos parcial de las células madre cardiovasculares en un sitio deseado. Las células pueden administrarse (suministrarse) mediante cualquier vía apropiada que dé como resultado la administración a una ubicación/tejido/sitio deseado en el sujeto donde al menos una parte de las células o componentes de las células permanece viable (el período de viabilidad de las células después de la administración puede ser de tan solo algunas horas a unos pocos días, hasta varios años).

Los modos de administración adecuados para los fines de la presente invención comprenden, por ejemplo (sin limitación) infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e intraesternal.

Debe entenderse que la expresión “excipiente farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una carga sólida o líquida, un diluyente, un excipiente, un portador, un disolvente o un material de encapsulación, implicado en suspender, mantener la actividad o llevar o transportar los agentes objeto desde un órgano, o parte del cuerpo, hasta otro órgano, o parte del cuerpo.

Debe entenderse que el término “derivado” o “variante”, tal como se usa en el presente documento, se refiere, por ejemplo, a un péptido, resto químico o ácido nucleico que difiere del polipéptido o ácido nucleico que se produce de manera natural en al menos un aminoácido o ácido nucleico, por ejemplo delecciones, adiciones, sustituciones o modificaciones de cadena lateral, pero que al mismo tiempo conserva una o más funciones y/o actividades específicas de la molécula que se produce de manera natural. Las sustituciones de aminoácidos pueden comprender alteraciones en las que un aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido diferente que se produce de manera natural o no convencional, y estas sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas. La presente invención se refiere, entre otros, al uso de agentes que activan la ruta canónica de Wnt. Los ejemplos de agentes que activan Wnt pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, fagos, peptidomiméticos, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas o grandes, ribozimas o moléculas inorgánicas o cualquier combinación de los mismos (opcionalmente que se producen de manera natural). Los agentes que activan la ruta canónica de Wnt pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos (policlonales o monoclonales), anticuerpos neutralizantes, fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, péptidos, proteínas, peptidomiméticos, aptámeros, oligonucleótidos, hormonas, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, hidratos de carbono o variantes de los mismos que funcionan para inactivar o activar uno o más, según sea el caso, de ácido nucleico y/o proteína participante en una ruta de Wnt tal como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica. Debe entenderse que las realizaciones a modo de ejemplo descritas anteriormente pueden modificarse sin apartarse del alcance de la invención, entre otros con respecto a los constituyentes, materiales y parámetros de procedimiento descritos aplicados. La invención se ejemplificará ahora adicionalmente con los ejemplos adjuntos, que naturalmente también pueden modificarse sin apartarse del alcance de la invención.

Sección experimental

Con el fin de desarrollar un sistema de cultivo libre de células alimentadoras donde pudiera seguirse el origen y la expansión de células $Isl1^+$, los inventores sintetizaron un constructo de plásmido que comprendía partes de la región promotora de $Isl1$ unida a la proteína fluorescente verde (GFP) como marcador fluorescente. El plásmido se introdujo en las células mediante electroporación. Se marcaron células mesenquimatosas (i) derivadas de corazones

embrionarios de rata, (ii) obtenidas de médula ósea de rata, (iii) obtenidas de la médula ósea de donantes jóvenes sanos, (iv) obtenidas de sangre de cordón humano, o (v) aisladas de fuentes amnióticas humanas, con el constructo génico de *Isl1* de manera simultánea a la adición de medio que contenía Wnt (100 ng/ml de Wnt-3a y BIO 2,5 mM). Las células alimentadoras usadas en estudios previos se reemplazaron en este protocolo por placas recubiertas previamente con diversas lamininas que comprendían una cadena $\alpha 5$ (en particular lamininas 511, laminina 521 y una combinación de las mismas). En cultivo, las células crecieron hasta la confluencia y se realizaron pases cada dos días. En cada pase, se analizaron las células de manera inmunohistoquímica para determinar la expresión de *Isl1*. Con cada pasaje sucesivo, aumentó la razón de células *Isl1*⁺, lo que también correspondía a la expresión de *Isl1* registrada directamente en la placa a través de la activación del constructo génico de *Isl1*. En la fracción inicial, menos del 1% de las células expresaron *Isl1*, que aumentó hasta el $73 \pm 18\%$ después de dos semanas en cultivo.

En el plazo de dos semanas, la población de células *Isl1*⁺ se había expandido 16 veces desde el inicio del protocolo de Wnt + laminina y el 35% de las células seguían proliferando expresando Ki67 al final del procedimiento de cultivo.

Las poblaciones puras de células *Isl1*⁺ no se habían derivado previamente de corazones fetales o embrionarios humanos. Para estudiar la capacidad de la fracción adherente de los corazones fetales o embrionarios humanos (semanas de gestación 5 a 10) para dar lugar a células *Isl1*⁺, estas células y las células aspiradas de médula ósea humana o aisladas de sangre de cordón umbilical se marcaron con el constructo génico de *Isl1*⁺ después de que las células hubieran crecido hasta la confluencia y antes de sembrarse en placas recubiertas previamente con laminina(s) que contenía(n) $\alpha 5$ según la presente invención. Adicionalmente, se utilizó de nuevo Wnt-3a 100 ng/ml para activar la ruta canónica de Wnt, pero esta vez se excluyó BIO y la concentración de suero fetal bovino (FBS) se aumentó hasta el 10%, las células proliferaron de manera similar a las células *Isl1*⁺ de rata. Estas células demostraron un patrón de crecimiento similar al de las células de rata y MSC de otros tejidos humanos (es decir, células mesenquimatosas que pueden obtenerse de médula ósea, células amnióticas o de sangre de cordón umbilical), y después de dos semanas, las células se habían expandido casi 70 veces desde el inicio del protocolo, generando un $92 \pm 2\%$ de poblaciones puras de células *Isl1*⁺. Al final del procedimiento de cultivo, más del 40% de las células todavía seguían proliferando expresando Ki67.

La fracción adherente inicial de los corazones fetales/embrionarios, que dan lugar a células *Isl1*⁺ tanto humanas como de rata, tienen un aspecto similar al de las células madre mesenquimatosas. Estas células pueden caracterizarse con respecto a su expresión de antígenos de superficie. Por tanto, se prepararon células adherentes de corazones embrionarios humanos (semana 6 de gestación), que se expandieron durante cinco semanas seguido de análisis de FACS usando el panel mesenquimatoso. La fracción adherente expresó los marcadores de células madre mesenquimatosas CD105, CD90, CD73 y CD44, mientras que fue negativa para los marcadores de linaje hematopoyético CD14, CD19, CD34, CD45 y el marcador endotelial CD31 (figura 3). Se detectaron perfiles de expresión similares usando células mesenquimatosas que pueden obtenerse de médula ósea o células de sangre de cordón umbilical. Para garantizar que las células no cambiaran su fenotipo durante la expansión, se extrajeron muestras de células de diferentes fuentes y se estimularon según el protocolo de Wnt/laminina. Esto produjo una razón y cantidades similares de células *Isl1*⁺. Estos hallazgos llevan a concluir que las células *Isl1*⁺ pueden generarse a partir de varias fuentes de células mesenquimatosas mediante la estimulación de la ruta canónica de Wnt cuando se cultiva en laminina(s) que comprende(n) una cadena $\alpha 5$.

Se estudió el perfil de expresión génica de células *Isl1*⁺ de rata y ser humano cultivadas y se comparó con las células *Isl1*⁺ presentes *in vivo* en los corazones embrionarios (figura 4). Estos estudios se realizaron para confirmar que las células *Isl1*⁺ cultivadas eran similares a las células *Isl1*⁺ que dan lugar al segundo campo cardiaco (SHF). Para identificar un grupo central de factores de transcripción que muy probablemente se activen en células *Isl1*⁺, se identificaron factores de transcripción relevantes que se ha demostrado que son importantes para regular el desarrollo de SHF en ratones. Estos estudios han identificado un conjunto de factores de transcripción que están íntimamente implicados en la red transcripcional del SHF. Estos incluyen miembros de la clase NK de proteínas de homeodominio, el factor de transcripción de dedos de zinc GATA4, el factor de transcripción de dominio MADS Mef2c, los factores de transcripción caja T y Forkhead, así como la clase Hand de factores de hélice-bucle-hélice básica (Hand). Posteriormente al factor de transcripción *Isl1*, la ruta de *Isl1*-GATA4-Mef2c parece desempeñar un papel fundamental para la activación de la cascada que induce la derivación de los cardiomiocitos. Los factores *Isl1* y GATA4 parecen interactuar para inducir la activación del factor de transcripción Mef2c, seguido por la regulación por incremento de los factores de transcripción Nkx2.5 y Hand2. Otros reguladores clave del SHF son el factor de transcripción Forkhead FoxH1, el factor de transcripción Tbx1, que depende de los factores Forkhead para su activación y finalmente Fgf8, que a su vez está regulado por Tbx1. Además, el bloqueo de la señalización de Fgf impide la expansión de las células *Isl1*⁺ en el SHF, lo que indica un efecto anterior en la ruta de *Isl1*. Las células *Isl1*⁺ de rata y ser humano cultivadas expresan los marcadores mesodérmicos TBX6 y Brachyury T, junto con los factores de transcripción clave mencionados anteriormente implicados en la red transcripcional del SHF, es decir, *Isl1*, Mef2c, Nkx2.5, FoxH1, Tbx1, Fgf8 y Fgf10. Además, también expresan el marcador de cardiomiocitos temprano, mesodermo posterior 1 (MESP1), mientras que son negativos para los marcadores de cardiomiocitos más maduros, troponina I (Tnl), troponina T (TnT) y las cadenas pesadas de miosina (Myh) 6 y 7.

Las células *Isl1*⁺ cultivadas demuestran un perfil de expresión génica similar al de las células *Isl1*⁺ aisladas de los

corazones embrionarios, excepto que estas células tienen una expresión aún mayor de los marcadores de cardiomiocitos tardíos Myh, TnT y Tnl. En las células Isl1⁺ humanas cultivadas, la ruta de Isl1-GATA4-MEF2c está más regulada por incremento que tanto en las células Isl1⁺ de rata cultivadas como en las células Isl1⁺ presentes *in vivo*. Esto se correlaciona bien con la regulación por incremento de los péptidos morfogénicos óseos (BMP), que son importantes para la estimulación de la cardiogénesis temprana y la regulación por incremento concomitante de los marcadores de cardiomiocitos tempranos Nkx2.5 y MESP1.

Otros hallazgos importantes son que las células Isl1⁺ tanto cultivadas como presentes *in vivo* expresan los marcadores de pluripotencia Tra-1, Sox2, Nanog y el antígeno 1 embrionario específico de estadio (SSEA-1), mientras que al mismo tiempo expresan nestina (NES), *paired box 3* (PAX3), que se sabe que se expresa en células de la cresta neural y, en menor medida, los marcadores de músculo liso miocárdico (MYOCD) y Myh11.

Según datos de microalineamientos, las células Isl1⁺ de rata y ser humano cultivadas son células madre multipotentes con una firma genética (Isl1⁺, KDR⁺, Nkx2.5⁺, Mef2c⁺) que se ha demostrado que son eficaces para diferenciarse en los tres linajes cardiovasculares con énfasis en los cardiomiocitos. Las células Isl1⁺ cultivadas también expresan los marcadores de células madre C-Kit, el marcador epicárdico Tbx18, junto con el marcador de superficie multipotente SSEA1, lo que hace que la relación entre estos marcadores de selección usados para identificar diferentes poblaciones de progenitores cardíacos sea un poco confusa. Quizás estos marcadores identifican diferentes estados de activación de células Isl1⁺, lo que al mismo tiempo demuestra la plasticidad de estas células.

En estudios anteriores se ha demostrado que las células Isl1⁺ están localizadas durante el período embrionario y postnatal en el infundíbulo (OFT). Incluso en el corazón adulto pueden encontrarse células Isl1⁺ residentes en esta región y responden a isquemia al migrar desde el OFT hacia las regiones isquémicas. Esto podría implicar que las células Isl1⁺ responden a la isquemia miocárdica dirigiéndose activamente a esta región. Con el fin de realizar un seguimiento de la capacidad de direccionamiento de las células Isl1⁺ *in vivo* y al mismo tiempo confirmar esta migración de manera inmunohistoquímica, se marcaron las células con luciferasa y transposones que expresan β-gal mediante electroporación. Puede realizarse un seguimiento de las células que expresan luciferasa *in vivo* con obtención de imágenes bioluminiscentes y las células que expresan β-gal pueden teñirse para ensayos de inmunohistoquímica. Mediante la utilización del sistema de transposón Sleeping-Beauty-100X (SB-100X), los transgenes se integraron de manera estable en el genoma. Se inyectaron células Isl1⁺ de rata marcadas en la pared del ventrículo izquierdo en ratas inmunoincompetentes y se detectó la migración de las células Isl1⁺ mediante un sistema de obtención de imágenes *in vivo* (IVIS[®]Spectrum CT) (PerkinElmer Inc., EE.UU.). En el plazo de 24 horas, la mayoría de las células Isl1⁺ habían comenzado a migrar hacia el infundíbulo y, en menor medida, quedaron células en el sitio de inyección (figuras 5A-C y 6A-C). Por el contrario, si las células Isl1⁺ se inyectaron en la región periisquémica inducida por la ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (LAD), la mayoría de las células no migraron al OFT. En cambio, se encontraron en infarto, donde a las 2 semanas se habían alargado y dispuesto en paralelo a los cardiomiocitos circundantes. Para caracterizar adicionalmente la capacidad de direccionamiento de las células Isl1⁺, se inyectaron en el ventrículo izquierdo de corazones normales y se siguió su migración con IVIS. En el plazo de 24 horas, se detectaron células Isl1⁺ en el OFT, pero después de la inducción de infarto de miocardio a través de ligadura de LAD, las células migraron a la región isquémica. Para estudiar adicionalmente las características de direccionamiento de las células Isl1⁺, se indujo un infarto de miocardio seguido por la administración por vía intravenosa de células Isl1⁺ marcadas a través de una vena de la cola. De nuevo, las células migraron al infarto de miocardio. Estos resultados implican que las células Isl1⁺ tienen capacidad de direccionamiento, especialmente a regiones isquémicas del corazón, pero también a zonas donde las células Isl1⁺ son residentes en el corazón embrionario y adulto. La explicación para esta respuesta migratoria podría ser que durante la isquemia miocárdica, los cardiomiocitos circundantes regulan por incremento CXCR4, que es el receptor para el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1). Se sabe que las células madre mesenquimatosas expresan SDF-1 y durante la isquemia estas células se dirigen desde la circulación hacia la región infartada estimuladas a través del eje SDF-1-CXCR4. Además, las células madre mesenquimatosas injertadas secretan SDF-1, que se demostró que provocan el direccionamiento de los progenitores cardíacos al infarto. Según los datos de microalineamientos, las células Isl1⁺ tanto cultivadas como especialmente las presentes *in vivo* expresan CXCR4, que probablemente media el direccionamiento de las células Isl1⁺ hacia la región isquémica. El eje SDF-1-CXCR4 también podría ser importante para dirigir las células Isl1⁺ al OFT de un corazón normal, ya que las células Isl1⁺ presentes *in vivo* tienen una alta expresión de este receptor.

En este estudio se ha demostrado que es posible derivar poblaciones puras de células Isl1⁺ de rata y ser humano de células mesenquimatosas de la médula ósea de donantes jóvenes sanos, de células mesenquimatosas obtenidas de sangre de cordón umbilical, de fuentes de saco amniótico y de células mesenquimatosas cardíacas embrionarias/fetales en un sistema de cultivo donde las células alimentadoras se han reemplazado por lamininas que comprenden una cadena α5 (en particular, lamininas 511, laminina 521 y una combinación de las mismas), y donde se usa un medio de cultivo que estimula la ruta canónica de Wnt. Tanto las células Isl1⁺ humanas como las de rata tienen un perfil de expresión génica similar al de sus respectivas células presentes *in vivo*, pero son más inmaduras. Las células Isl1⁺ cultivadas tienen una firma genética que es favorable para la diferenciación en los tres linajes cardiovasculares y se dirigen activamente hacia el miocardio isquémico. En este estudio también se ha ideado un método para diferenciar células Isl1⁺ en células cardíacas (cardiomiocitos, células de músculo liso y

células endoteliales), incluyendo laminina 111, 211 o 221, o cualquier combinación de las mismas, en el medio de cultivo. Estas características son beneficiosas para el uso de células *Isl1*⁺ para reparar corazones dañados después de un infarto de miocardio. Otro campo son las cardiopatías congénitas, donde los defectos que afectan el arco aórtico, las arterias pulmonares proximales y el infundíbulo representan casi el 30% de todos los defectos cardíacos congénitos. Estos defectos pueden deberse a alteraciones en la migración, diferenciación o proliferación del SHF y quizás en el futuro puedan usarse células *Isl1*⁺ cultivadas *ex vivo* para el tratamiento *in utero* de estos defectos cardíacos. Esto refleja la magnitud de la importancia de estos hallazgos, que con suerte añadirán una nueva dimensión a la cardiología regenerativa.

Animales y ética

El comité para el cuidado de los animales del Hospital Universitario Karolinska aprobó todos los procedimientos experimentales con animales. En este estudio se usaron ratas gestantes Sprague-Dawley (B&K Universal AB, Sollentuna, Suecia) en el día 14 de gestación y ratas desnudas Rowett (RNU, genotipo *rn/rnu*) (Charles River Deutschland Inc., Alemania) con un peso de 250-300 g. Para recoger tejido de médula ósea y sangre de cordón umbilical se obtuvo un permiso individual usando un procedimiento de consentimiento informado convencional y la aprobación previa del comité ético regional. Para recoger tejido embrionario humano (semanas de gestación 5 a 10), se obtuvo el permiso individual mediante un procedimiento de consentimiento informado convencional y la aprobación previa del comité ético regional. La investigación se ajusta a los principios expuestos en la Declaración de Helsinki.

Clonación del constructo *Isl1*-promotor y transfección de las células mesenquimatosas

Se amplificó un fragmento de ADN genómico humano de 3 kb en el sentido de 5' de un codón de inicio de *Isl1* (-3 a -3170 de ATG) mediante PCR con una ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad (Thermo Scientific). Cebador directo 5' - aaa gag ctc GGT GTA ACA GCC ACA TTT -3' y cebador inverso 5' - gga gaa ttc CTG TAA GAG GGA GTA ATG TC -3'. Se clonó el producto de PCR en la MCS del vector pEGFP-1 (Clontech Laboratories Inc., EE.UU.) entre los sitios de escisión de enzimas de restricción *SacI* y *EcoRI*. Se introdujo el plásmido *Isl1* en las células de rata y ser humano usando el sistema de electroporación Neon™ (Invitrogen, EE.UU.). Se usaron células *Isl1*⁺ pancreáticas de cerdo como controles positivos, mientras que se usaron células endoteliales aórticas humanas (HAEC) como controles negativos para el constructo génico de *Isl1*.

Derivación y expansión de células *Isl1*⁺ a partir de corazones de rata embrionarios

Para cada experimento, se usaron 10 ratas gestantes Sprague-Dawley (día de gestación, DG, 13 a 14). Se sacrificó a las ratas en una cámara de CO₂, después de lo cual se extrajeron los embriones completos (aproximadamente 10 embriones/rata) a través de una incisión abdominal en la parte inferior de la línea media. De cada embrión se extrajo el corazón bajo el microscopio, se cortó en fragmentos pequeños y se enjuagó repetidamente con solución salina tamponada de Hank (HBSS) (GibcoBRL, NY, EE.UU.). Los fragmentos de corazón se predigerieron durante la noche a 4°C en disolución de tripsina 0,5 mg/ml en HBSS. La siguiente etapa fue preparar la fracción mesenquimatosas, que es una modificación del protocolo desarrollado por Laugwitz y colaboradores (Laugwitz *et al.* 2005). Los fragmentos de corazón predigeridos se trataron con collagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) 240 U/ml en HBSS, 2-3 ml por ronda en la estufa de incubación a 37°C, durante de 10 a 15 min con agitación suave. Entonces se centrifugó el sobrenadante a 330-350 g durante 8 min, se resuspendió en HBSS enfriado en hielo. Este procedimiento se repitió hasta que los fragmentos de corazón se disociaron. Las células reunidas se lavaron nuevamente, se centrifugaron a 330-350 g dos veces y se resuspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) 4,5/M199 (4:1) (GibcoBRL) que contenía un 10% de suero de caballo (GibcoBRL) y un 5% de suero fetal bovino (FBS) (PAA Laboratories Inc., EE.UU.) con MycoZap (Lonza, Suiza). La fracción mesenquimatosas (adherente) se separó de los cardiomiocitos y las células endoteliales mediante dos rondas de cultivo en pocillos de plástico durante 1 hora en la estufa de incubación a 37°C, el 5% de CO₂ en el 3% de O₂. Con el fin de realizar un seguimiento de la derivación de las células *Isl1*⁺ procedentes de la fracción adherente, estas células se marcaron con el constructo génico de *Isl1* que contenía el promotor para el gen de *Isl1* unido al gen de la proteína fluorescente verde (GFP) (descrito anteriormente). Este constructo génico permite realizar un seguimiento de la derivación de células *Isl1*⁺ directamente en la placa de cultivo. Para estimular la transformación de las células mesenquimatosas en células *Isl1*⁺, se separó la fracción adherente usando TrypLE™ Express (GibcoBRL) y se volvió a cultivar en placas recubiertas con una capa delgada de laminina 511, 521 o una combinación de estas, se cultivaron en medio DMEM con alto contenido en glucosa (GibcoBRL), MycoZap (Lonza), Hepes (25 mM) (GibcoBRL), glutamina (2 mM) (Fisher Scientific) y el 15% de FBS (PAA) en una estufa de incubación a 37°C, el 5% de CO₂ en el 3% de O₂. En la confluencia (48 h), se separaron las células usando TrypLE™ Express (GibcoBRL) y se volvieron a cultivar en placas recubiertas con laminina 511, 521 o una combinación de estas, en medio de Wnt que contenía DMEM/F12 complementado con 1 ml de B27 (GibcoBRL), el 2% de FBS (PAA), MycoZap (Lonza), factor de crecimiento epidérmico (EGF, 10 ng/ml) (R & D systems, Minneapolis, EE.UU.), BIO 2,5 mM (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Wnt 3a (100 ng/ml) (R & D systems). En la confluencia, se realizaron pases de las células y volvieron a cultivarse en pocillos recubiertos con laminina 511, 521 o una combinación de estas, en el mismo medio. En cada pase, se recogieron células para los análisis descritos a continuación. Después de dos semanas de tratamiento con el medio de Wnt, se finalizó el procedimiento de cultivo y se recogieron las células para su análisis o inyecciones adicionales.

Además, también se congelaron y se descongelaron células adherentes de diferentes puntos de tiempo. La congelación de las células adherentes cultivadas se realizó separando las células y resuspendiéndolas después de la centrifugación en medio de cultivo celular de congelación enfriado Recovery™ (GibcoBRL). Las células se transfirieron a viales de almacenamiento y se congelaron gradualmente (-1°C por minuto) hasta -70°C y luego se transfirieron a nitrógeno líquido (-180°C). Cuando las células congeladas volvieron a estar en cultivo, se descongelaron rápidamente hasta 37°C, se lavaron y se volvieron a cultivar en placas de plástico recubiertas con laminina 511, 521 o una combinación de estas, en el mismo medio de Wnt y las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente.

Derivación y expansión de células Isl1⁺ humanas

La aspiración de células de médula ósea se llevó a cabo tal como se describió anteriormente a partir de donantes humanos jóvenes. Se recogieron células de sangre de cordón umbilical y células amnióticas y se aislaron usando procedimientos convencionales habituales. El aborto se realizó según una técnica descrita previamente por Westgren *et al.* (Acta Scand Obstet Gynecol 73, 601-604 1994)). El material cardíaco se cortó en fragmentos pequeños y se predigirió durante la noche tal como se ha descrito para los corazones embrionarios de rata. Los siguientes procedimientos siguieron las mismas etapas que para el cultivo de células Isl1⁺ de rata, excepto que el procedimiento de siembra en placa previo se amplió a 72 horas y se realizó en medio de células madre mesenquimatosas con DMEM con bajo contenido en glucosa (GibcoBRL), el 10% de FBS (PAA) y MycoZap (Lonza). Como alternativa, puede emplearse medio de cultivo libre de componentes no humanos, en el que el FBS se reemplaza por plaquetas lisadas que pueden obtenerse de sangre humana. Con el fin de realizar un seguimiento de la derivación de las células Isl1⁺, las células mesenquimatosas se marcaron usando el mismo constructo génico de Isl1 que para la derivación de las células Isl1⁺ de rata. Para estimular la transformación en células Isl1⁺, se usaron condiciones de cultivo similares a las de las células Isl1⁺ de rata con laminina 511, 521 o una combinación de estas como matriz de recubrimiento, pero con un medio de Wnt donde se excluyó BIO y el nivel de suero aumentó hasta el 15% de FBS (PAA) (o plaquetas humanas lisadas a una concentración adecuada). Después de cada pase, las células se guardaron para análisis adicionales y después de 2 semanas se terminó el procedimiento de cultivo y se recogieron las células para tinción inmunohistoquímica y análisis de microalineamiento. Las células mesenquimatosas de diferentes períodos de tiempo también se congelaron y descongelaron tal como se describió para las células Isl1⁺ de rata.

Análisis inmunohistoquímicos de las células Isl1⁺ cultivadas

En cada pase y al final del procedimiento de cultivo, las células se citocentrifugaron y se analizaron inmunohistoquímicamente para detectar la presencia de células Isl1⁺ y también se determinó Ki67 para detectar la proliferación celular. Las células citocentrifugadas se almacenaron inicialmente congeladas, seguido por fijación en formaldehído al 4%, se bloquearon con suero y se incubaron con los anticuerpos primarios; Isl1: anticuerpo de cabra anti-Isl1 humano (R&D systems); Ki67: anticuerpo de ratón anti-Ki67 de rata (clon MIB-5, DakoCytomation, Dinamarca) y anticuerpo de ratón conjugado directo anti-Ki67 humano (clon MIB-1, DakoCytomation) respectivamente. Para visualizar los anticuerpos primarios no conjugados, se lavaron las secciones y se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia; Isl1: Alexa Fluor 488 – anticuerpo de conejo anti-cabra (Molecular Probes, Invitrogen) y para Ki67: Alexa fluor 568 – anticuerpo de cabra anti-ratón (Molecular Probes). Se realizó tinción con anticuerpos de control, así como tinción de tejidos de control negativos y positivos, para verificar la especificidad de todos los anticuerpos.

Expansión de las células mesenquimatosas humanas para análisis de citometría de flujo

Se prepararon células madre mesenquimatosas (MSC) humanas de diferentes fuentes según el mismo protocolo descrito anteriormente. En lugar de cambiar al medio de Wnt, las MSC se mantuvieron en DMEM con alto contenido en glucosa (GibcoBRL), MycoZap (Lonza), Hepes (25 mM) (GibcoBRL), glutamina (2 mM) (Fisher Scientific) y el 15% de FBS (PAA) durante cinco semanas a 37°C, aire humidificado que contenía el 5% de CO₂ y el 3% de O₂. Se realizaron pases de las células dos veces durante este tiempo, seguido de citometría de flujo. Con el fin de someter a prueba que se habían expandido las MSC correctas, las células se transfirieron a pocillos recubiertos con laminina 511, 521 o una combinación de estas, para el cultivo continuado durante otras dos semanas en medio de Wnt, seguido por análisis inmunohistoquímico de la expresión de Isl1.

Citometría de flujo

Se lavaron aproximadamente 0,85x10⁵ células por tinción individual en PBS, se centrifugaron una vez a 300 g durante 5 min y se incubaron a 4°C durante 30 min con cantidades apropiadas de anticuerpo. Entonces se lavaron las células marcadas en PBS igual que anteriormente. Para la caracterización de la fracción mesenquimatosa se usó el siguiente panel que contenía anticuerpos monoclonales (AcM) conjugados con fluorocromo contra los antígenos de superficie humanos: CD31 (WM59), CD34 (581), CD73 (AD2), CD44 (G44-26), CD14 (MoP9), CD19 (HIB19), CD105 (266) (todos de BD Biosciences, San José, CA); HLA DR (Tu36), CD45 (HI30) (Invitrogen) y CD90 (eBio5E10) (eBioscience Inc., EE.UU.). Cada clon de anticuerpo se tituló a una concentración de tinción óptima

usando muestras humanas primarias. La adquisición de datos se realizó en un dispositivo CyFlow ML (Partec GmbH, Munster, Alemania), seguido por análisis de datos con el software FloJo (TreeStar Inc., EE.UU.).

Microdissección de captura por láser (LCM)

Se recogieron criosecciones (7 µm) de embriones de ratas completos (GD 13), cortados en un plano transversal desde la cabeza hasta la cola y criosecciones (7 µm) de un corazón embrionario humano (semana gestacional 9,5) y MSC derivadas de médula ósea en portaobjetos de vidrio estériles, así como en portaobjetos de vidrio recubiertos con membrana de PEN (poli(naftalato de etileno)) de 1 µm de espesor (Carl Zeiss, Alemania). Se escogieron las zonas seleccionadas como objetivo, incluyendo tanto las positivas como las negativas para Isl1, para la captura usando objetivos 10x y 40x. Las regiones negativas se recogieron del ventrículo izquierdo en desarrollo. La criosección se realizó usando el protocolo 4-2-4, en el que cada portaobjetos se montó con 3 secciones. Al usar este protocolo, se precedieron dos portaobjetos de membrana no teñidos y les siguieron cuatro portaobjetos crioseccionados, que posteriormente se tiñeron hacia Isl1, usando los mismos anticuerpos primarios y secundarios que para las células cultivadas. Estos protocolos tenían como objetivo localizar histoanatómicamente las zonas positivas y negativas para Isl1, así como generar un rendimiento de ARN de alta calidad. El procedimiento de microdissección se realizó mediante la identificación de las células de interés, que en la siguiente etapa se delinearon y se cortaron mediante disección con láser. Se capturaron por láser las zonas positivas y negativas para Isl1 equivalentes y se aisló el ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARN PicoPure (PicoPure RNA isolation kit, Arcturus Engineering, Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad y la calidad del ARN se determinaron usando el dispositivo 2100 Agilent Bioanalyzer, RNA 6000 Pico LabChip (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.). Todas las muestras de ARN se almacenaron en condiciones estériles a -80°C para análisis futuros. Se cumplieron todas las medidas de seguridad para evitar la degradación del ARN.

Análisis de microalineamiento

Se aisló el ARN total de células Isl1⁺ cultivadas de rata y ser humano utilizando el kit de aislamiento de ARN PicoPure (PicoPure RNA isolation kit) siguiendo el protocolo del fabricante tal como se describió en la sección anterior. Cantidades equivalentes (aproximadamente 2 ng) de ARN total purificado de tejidos microdisseccionados, así como de células cultivadas se sometieron a transcripción inversa y se amplificaron usando el sistema Ovation Pico WTA (NuGEN Technologies, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc de cadena de sentido usando el WT-Ovation Exon Module (NuGEN Technologies). El ADNc se fragmentó y se marcó usando el Encore Biotin Module (NuGEN). El ADNc marcado se hibridó con los microalineamientos Affymetrix Rat and Human Gene ST 1.0 (Affymetrix Inc., CA, EE.UU.) respectivamente. Se lavaron los GeneChip, se tiñeron y se examinaron usando el dispositivo Fluidic Station 450 y GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix).

El procesamiento previo de los datos de microalineamiento se realizó en la herramienta Affymetrix Expression Console (v. 1.1) (Affymetrix Inc.) usando los siguientes métodos: Resumen: PLIER; Corrección de fondo: PM-GCBG; Normalización: Mediana global.

Generación de matrices cromáticas

Se crearon matrices cromáticas con Qlucore Omics Explorer 2.2. La agrupación jerárquica tanto de las muestras como de las variables se realizó usando datos y métrica euclídea donde cada variable se normalizó a media 0 y varianza 1. Se usaron la unión promedio y la transformación log2 de las señales. La escala de color de la matriz cromática varía desde el rojo (alta expresión) pasando por el negro (expresión promedio) hasta el verde (baja expresión).

Anestesia y atención posoperatoria

Se anestesiaron ratas RNU (genotipo rn/rnu, Charles River Deutschland Inc.) usadas para inyección intramiocárdica de células Isl1⁺ de rata marcadas con una inyección subcutánea de midazolam (Dormicum, 5 mg/kg) (Algol Pharma AB, Alemania), clorhidrato de medetomidina (Domitor vet, 0,1 mg/kg) (Orion Corp., Espoo, Finlandia), fentanilo (0,3 mg/kg) (B. Braun Medical AG, Seesatz, Suiza) y posteriormente se intubaron endotraquealmente para poder realizar las inyecciones intramiocárdicas e inducir infartos de miocardio descritos a continuación. Se mantuvo ventilación con presión positiva a una velocidad de 100 ciclos por minuto con un volumen corriente de 4-5 ml con aire ambiental usando un respirador (7025 Rodent ventilator, UGO BASILE S.R.L, Italia).

La anestesia se revirtió mediante una inyección intramuscular de flumazenilo (Lanexat, 0,1 mg/kg) (Hameln Pharma, Alemania) y clorhidrato de tipamezol (Antisedan vet 5 mg/kg) (Orion Corp., Espoo, Finlandia). La analgesia posoperatoria se mantuvo administrando clorhidrato de buprenorfina (Temgesic, 0,004 mg/kg/dos veces al día durante 3 días) (Schering-Plough Corp., Bélgica). Se excluyeron del estudio las ratas que mostraron signos de insuficiencia.

Estudio de la supervivencia *in vivo* y migración de células Isl1⁺ marcadas

Las ratas RNU se dividieron en cuatro grupos dependiendo de cómo se inyectaron las células Isl1⁺. En cada experimento, los corazones se expusieron a través de una toracotomía izquierda. En los grupos de infarto de miocardio, la arteria descendente anterior izquierda (LAD) se ligó permanentemente y se confirmó la inducción de infarto mediante cambio de color y discinesia de la pared anterolateral del ventrículo izquierdo. En cada experimento se usaron 1 millón de células Isl1⁺ marcadas (obtenidas o bien de tejido cardíaco o bien de médula ósea), excepto para el experimento intravenoso donde se inyectaron 4 millones de células. Antes de la inyección, las células Isl1⁺ se marcaron con 2 µg de pT2/C-fluc (Addgene, EE.UU.), 2 µg de pT2-β-gal y 1 µg de SB 100X utilizando el sistema de electroporación Neon™ (Invitrogen). Con el fin de detectar las células después de la implantación en el miocardio, se inyectó D-luciferina (300 mg/kg) por vía intraperitoneal, seguido de 15 min de incubación. La obtención de imágenes de bioluminiscencia se realizó en la siguiente etapa en el dispositivo IVIS®Spectrum CT (Perkin Elmer Inc.) usando una exposición de 5 min y ajustes de alta sensibilidad. Se obtuvieron imágenes de las ratas en una posición ventral para poder detectar la expresión de las células trasplantadas y cuantificar el flujo total usando el software Living Image (Perkin Elmer Inc.). La imagen de TC correspondiente se realizó en un dispositivo Quantum FX µCT (Caliper, Perkin Elmer Inc.) con un tiempo de exploración de 17 s. Las imágenes luminiscentes se superpusieron en la exploración de TC correspondiente.

Las ratas se dividieron en los siguientes grupos: 1) inyección en la pared ventricular izquierda de un corazón normal (n = 4); 2) Inyección en la región periisquémica del ventrículo izquierdo, directamente después de la inducción de un infarto de miocardio (n = 4). Se realizó el seguimiento de la supervivencia y la distribución celulares mediante IVIS (Perkin Elmer Inc.) y los corazones se recogieron a las 1 y 2 semanas para el análisis inmunohistoquímico para confirmar los datos de IVIS; 3) Inyección en la pared ventricular izquierda de un miocardio normal, seguido tres días después por la inducción de un infarto de miocardio a través de una nueva toracotomía y ligadura de LAD (n = 3); 4) Inducción de un infarto de miocardio seguido por inyección intravenosa a través de la vena de la cola 8 horas después de la inducción del infarto (n = 2). Dado que se encontró que la supervivencia y la distribución celulares se correlacionan bien con la señal de IVIS, sólo se realizó el seguimiento de los animales en los grupos 3 y 4 con IVIS durante 1 semana.

Detección de células Isl1⁺ de rata tras inyección intramiocárdica

Los corazones se recogieron y se realizaron cortes congelados en secciones de 7 µm de espesor. Se usaron tinciones con hematoxilina y eosina para obtener una visión general de las diferentes zonas y subdominios de los corazones. A partir de estas secciones, fue posible entonces dirigir la tinción de X-gal a las regiones de interés. La tinción de X-gal se realizó usando un kit de tinción de β-gal (K1465-01) (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Lista de secuencias

SEQ ID No. 1: Cadena alfa 1 de la laminina humana

MetArgGlyGlyValLeuLeuValLeuLeuLeuCysValAlaAlaGlnCysArgGlnArg
 GlyLeuPheProAlaIleLeuAsnLeuAlaSerAsnAlaHisIleSerThrAsnAlaThr
 CysGlyGluLysGlyProGluMetPheCysLysLeuValGluHisValProGlyArgPro
 ValArgAsnProGlnCysArgIleCysAspGlyAsnSerAlaAsnProArgGluArgHis
 ProlleSerHisAlaIleAspGlyThrAsnAsnTrpTrpGlnSerProSerIleGlnAsn
 GlyArgGluTyrHisTrpValThrIleThrLeuAspLeuArgGlnValPheGlnValAla
 TyrValIleIleLysAlaAlaAsnAlaProArgProGlyAsnTrpIleLeuGluArgSer
 LeuAspGlyThrThrPheSerProTrpGlnTyrTyrAlaValSerAspSerGluCysLeu
 SerArgTyrAsnIleThrProArgArgGlyProProThrTyrArgAlaAspAspGluVal
 IleCysThrSerTyrTyrSerArgLeuValProLeuGluHisGlyGluIleHisThrSer
 LeuIleAsnGlyArgProSerAlaAspAspLeuSerProLysLeuLeuGluPheThrSer
 AlaArgTyrIleArgLeuArgLeuGlnArgIleArgThrLeuAsnAlaAspLeuMetThr
 LeuSerHisArgGluProLysGluLeuAspProlleValThrArgArgTyrTyrTyrSer
 IleLysAspIleSerValGlyGlyMetCysIleCysTyrGlyHisAlaSerSerCysPro
 TrpAspGluThrThrLysLysLeuGlnCysGlnCysGluHisAsnThrCysGlyGluSer
 CysAsnArgCysCysProGlyTyrHisGlnGlnProTrpArgProGlyThrValSerSer
 GlyAsnThrCysGluAlaCysAsnCysHisAsnLysAlaLysAspCysTyrTyrAspGlu
 SerValAlaLysGlnLysLysSerLeuAsnThrAlaGlyGlnPheArgGlyGlyGlyVal
 CysIleAsnCysLeuGlnAsnThrMetGlyIleAsnCysGluThrCysIleAspGlyTyr
 TyrArgProHisLysValSerProTyrGluAspGluProCysArgProCysAsnCysAsp
 ProValGlySerLeuSerSerValCysIleLysAspAspLeuHisSerAspLeuHisAsn
 GlyLysGlnProGlyGlnCysProCysLysGluGlyTyrThrGlyGluLysCysAspArg
 CysGlnLeuGlyTyrLysAspTyrProThrCysValSerCysGlyCysAsnProValGly
 SerAlaSerAspGluProCysThrGlyProCysValCysLysGluAsnValGluGlyLys
 AlaCysAspArgCysLysProGlyPheTyrAsnLeuLysGluLysAsnProArgGlyCys
 SerGluCysPheCysPheGlyValSerAspValCysSerSerLeuSerTrpProValGly
 GlnValAsnSerMetSerGlyTrpLeuValThrAspLeuIleSerProArgLysIlePro

SerGlnGlnAspAlaLeuGlyGlyArgHisGlnValSerIleAsnAsnThrAlaValMet
 GlnArgLeuAlaProLysTyrTyrTrpAlaAlaProGluAlaTyrLeuGlyAsnLysLeu
 ThrAlaPheGlyGlyPheLeuLysTyrThrValSerTyrAspIleProValGluThrVal
 AspSerAsnLeuMetSerHisAlaAspValIleLysGlyAsnGlyLeuThrLeuSer
 ThrGlnAlaGluGlyLeuSerLeuGlnProTyrGluGluTyrLeuAsnValValArgLeu
 ValProGluAsnPheGlnAspPheHisSerLysArgGlnIleAspArgAspGlnLeuMet
 ThrValLeuAlaAsnValThrHisLeuLeuIleArgAlaAsnTyrAsnSerAlaLysMet
 AlaLeuTyrArgLeuGluSerValSerLeuAspIleAlaSerSerAsnAlaIleAspLeu
 ValValAlaAlaAspValGluHisCysGluCysProGlnGlyTyrThrGlyThrSerCys
 GluSerCysLeuSerGlyTyrTyrArgValAspGlyIleLeuPheGlyGlyIleCysGln
 ProCysGluCysHisGlyHisAlaAlaGluCysAsnValHisGlyValCysIleAlaCys
 AlaHisAsnThrThrGlyValHisCysGluGlnCysLeuProGlyPheTyrGlyGluPro
 SerArgGlyThrProGlyAspCysGlnProCysAlaCysProLeuThrIleAlaSerAsn
 AsnPheSerProThrCysHisLeuAsnAspGlyAspGluValValCysAspTrpCysAla
 ProGlyTyrSerGlyAlaTrpCysGluArgCysAlaAspGlyTyrTyrGlyAsnProThr
 ValProGlyGluSerCysValProCysAspCysSerGlyAsnValAspProSerGluAla
 GlyHisCysAspSerValThrGlyGluCysLeuLysCysLeuGlyAsnThrAspGlyAla
 HisCysGluArgCysAlaAspGlyPheTyrGlyAspAlaValThrAlaLysAsnCysArg
 AlaCysGluCysHisValLysGlySerHisSerAlaValCysHisLeuGluThrGlyLeu
 CysAspCysLysProAsnValThrGlyGlnGlnCysAspGlnCysLeuHisGlyTyrTyr
 GlyLeuAspSerGlyHisGlyCysArgProCysAsnCysSerValAlaGlySerValSer
 AspGlyCysThrAspGluGlyGlnCysHisCysValProGlyValAlaGlyLysArgCys
 AspArgCysAlaHisGlyPheTyrAlaTyrGlnAspGlySerCysThrProCysAspCys
 ProHisThrGlnAsnThrCysAspProGluThrGlyGluCysValCysProProHisThr
 GlnGlyValLysCysGluGluCysGluAspGlyHisTrpGlyTyrAspAlaGluValGly
 CysGlnAlaCysAsnCysSerLeuValGlySerThrHisHisArgCysAspValValThr
 GlyHisCysGlnCysLysSerLysPheGlyGlyArgAlaCysAspGlnCysSerLeuGly
 TyrArgAspPheProAspCysValProCysAspCysAspLeuArgGlyThrSerGlyAsp
 AlaCysAsnLeuGluGlnGlyLeuCysGlyCysValGluGluThrGlyAlaCysProCys
 LysGluAsnValPheGlyProGlnCysAsnGluCysArgGluGlyThrPheAlaLeuArg
 AlaAspAsnProLeuGlyCysSerProCysPheCysSerGlyLeuSerHisLeuCysSer

GluLeuGluAspTyrValArgThrProValThrLeuGlySerAspGlnProLeuLeuArg
 ValValSerGlnSerAsnLeuArgGlyThrThrGluGlyValTyrTyrGlnAlaProAsp
 PheLeuLeuAspAlaAlaThrValArgGlnHisIleArgAlaGluProPheTyrTrpArg
 LeuProGlnGlnPheGlnGlyAspGlnLeuMetAlaTyrGlyGlyLysLeuLysTyrSer
 ValAlaPheTyrSerLeuAspGlyValGlyThrSerAsnPheGluProGlnValLeulle
 LysGlyGlyArgIleArgLysGlnValIleTyrMetAspAlaProAlaProGluAsnGly
 ValArgGlnGluGlnGluValAlaMetArgGluAsnPheTrpLysTyrPheAsnSerVal
 SerGluLysProValThrArgGluAspPheMetSerValLeuSerAspIleGluTyrIle
 LeulleLysAlaSerTyrGlyGlnGlyLeuGlnGlnSerArgIleSerAspIleSerMet
 GluValGlyArgLysAlaGluLysLeuHisProGluGluGluValAlaSerLeuLeuGlu
 AsnCysValCysProProGlyThrValGlyPheSerCysGlnAspCysAlaProGlyTyr
 HisArgGlyLysLeuProAlaGlySerAspArgGlyProArgProLeuValAlaProCys
 ValProCysSerCysAsnAsnHisSerAspThrCysAspProAsnThrGlyLysCysLeu
 AsnCysGlyAspAsnThrAlaGlyAspHisCysAspValCysThrSerGlyTyrTyrGly
 LysValThrGlySerAlaSerAspCysAlaLeuCysAlaCysProHisSerProProAla
 SerPheSerProThrCysValLeuGluGlyAspHisAspPheArgCysAspAlaCysLeu
 LeuGlyTyrGluGlyLysHisCysGluArgCysSerSerSerTyrTyrGlyAsnProGln
 ThrProGlyGlySerCysGlnLysCysAspCysAsnProHisGlySerValHisGlyAsp
 CysAspArgThrSerGlyGlnCysValCysArgLeuGlyAlaSerGlyLeuArgCysAsp
 GluCysGluProArgHisIleLeuMetGluThrAspCysValSerCysAspAspGluCys
 ValGlyValLeuLeuAsnAspLeuAspGluIleGlyAspAlaValLeuSerLeuAsnLeu
 ThrGlyIleIleProValProTyrGlyIleLeuSerAsnLeuGluAsnThrThrLysTyr
 LeuGlnGluSerLeuLeuLysGluAsnMetGlnLysAspLeuGlyLysIleLysLeuGlu
 GlyValAlaGluGluThrAspAsnLeuGlnLysLysLeuThrArgMetLeuAlaSerThr
 GlnLysValAsnArgAlaThrGluArgIlePheLysGluSerGlnAspLeuAlaIleAla
 IleGluArgLeuGlnMetSerIleThrGluIleMetGluLysThrThrLeuAsnGlnThr
 LeuAspGluAspPheLeuLeuProAsnSerThrLeuGlnAsnMetGlnGlnAsnGlyThr
 SerLeuLeuGluIleMetGlnIleArgAspPheThrGlnLeuHisGlnAsnAlaThrLeu
 GluLeuLysAlaAlaGluAspLeuLeuSerGlnIleGlnGluAsnTyrGlnLysProLeu
 GluGluLeuGluValLeuLysGluAlaAlaSerHisValLeuSerLysHisAsnAsnGlu
 LeuLysAlaAlaGluAlaLeuValArgGluAlaGluAlaLysMetGlnGluSerAsnHis

LeuLeuLeuMetValAsnAlaAsnLeuArgGluPheSerAspLysLysLeuHisValGln
 GluGluGlnAsnLeuThrSerGluLeulleValGlnGlyArgGlyLeulleAspAlaAla
 AlaAlaGlnThrAspAlaValGlnAspAlaLeuGluHisLeuGluAspHisGlnAspLys
 LeuLeuLeuTrpSerAlaLysIleArgHisHisIleAspAspLeuValMetHisMetSer
 GlnArgAsnAlaValAspLeuValTyrArgAlaGluAspHisAlaAlaGluPheGlnArg
 LeuAlaAspValLeuTyrSerGlyLeuGluAsnIleArgAsnValSerLeuAsnAlaThr
 SerAlaAlaTyrValHisTyrAsnIleGlnSerLeulleGluGluSerGluGluLeuAla
 ArgAspAlaHisArgThrValThrGluThrSerLeuLeuSerGluSerLeuValSerAsn
 GlyLysAlaAlaValGlnArgSerSerArgPheLeuLysGluGlyAsnAsnLeuSerArg
 LysLeuProGlyIleAlaLeuGluLeuSerGluLeuArgAsnLysThrAsnArgPheGln
 GluAsnAlaValGluIleThrArgGlnThrAsnGluSerLeuLeulleLeuArgAlalle
 ProLysGlyIleArgAspLysGlyAlaLysThrLysGluLeuAlaThrSerAlaSerGln
 SerAlaValSerThrLeuArgAspValAlaGlyLeuSerGlnGluLeuLeuAsnThrSer
 AlaSerLeuSerArgValAsnThrThrLeuArgGluThrHisGlnLeuLeuGlnAspSer
 ThrMetAlaThrLeuLeuAlaGlyArgLysValLysAspValGluIleGlnAlaAsnLeu
 LeuPheAspArgLeuLysProLeuLysMetLeuGluGluAsnLeuSerArgAsnLeuSer
 GlulleLysLeuLeulleSerGlnAlaArgLysGlnAlaAlaSerIleLysValAlaVal
 SerAlaAspArgAspCysIleArgAlaTyrGlnProGlnIleSerSerThrAsnTyrAsn
 ThrLeuThrLeuAsnValLysThrGlnGluProAspAsnLeuLeuPheTyrLeuGlySer
 SerThrAlaSerAspPheLeuAlaValGluMetArgArgGlyArgValAlaPheLeuTrp
 AspLeuGlySerGlySerThrArgLeuGluPheProAspPheProlleAspAspAsnArg
 TrpHisSerIleHisValAlaArgPheGlyAsnIleGlySerLeuSerValLysGluMet
 SerSerAsnGlnLysSerProThrLysThrSerLysSerProGlyThrAlaAsnValLeu
 AspValAsnAsnSerThrLeuMetPheValGlyGlyLeuGlyGlyGlnIleLysLysSer
 ProAlaValLysValThrHisPheLysGlyCysLeuGlyGluAlaPheLeuAsnGlyLys
 SerIleGlyLeuTrpAsnTyrIleGluArgGluGlyLysCysArgGlyCysPheGlySer
 SerGlnAsnGluAspProSerPheHisPheAspGlySerGlyTyrSerValValGluLys
 SerLeuProAlaThrValThrGlnIleIleMetLeuPheAsnThrPheSerProAsnGly
 LeuLeuLeuTyrLeuGlySerTyrGlyThrLysAspPheLeuSerIleGluLeuPheArg
 GlyArgValLysValMetThrAspLeuGlySerGlyProlleThrLeuLeuThrAspArg
 ArgTyrAsnAsnGlyThrTrpTyrLysIleAlaPheGlnArgAsnArgLysGlnGlyVal

LeuAlaValIleAspAlaTyrAsnThrSerAsnLysGluThrLysGlnGlyGluThrPro
 GlyAlaSerSerAspLeuAsnArgLeuAspLysAspProlleTyrValGlyGlyLeuPro
 ArgSerArgValValArgArgGlyValThrThrLysSerPheValGlyCysIleLysAsn
 LeuGluIleSerArgSerThrPheAspLeuLeuArgAsnSerTyrGlyValArgLysGly
 CysLeuLeuGluProlleArgSerValSerPheLeuLysGlyGlyTyrIleGluLeuPro
 ProLysSerLeuSerProGluSerGluTrpLeuValThrPheAlaThrThrAsnSerSer
 GlyIleIleLeuAlaAlaLeuGlyGlyAspValGluLysArgGlyAspArgGluGluAla
 HisValProPhePheSerValMetLeuIleGlyGlyAsnIleGluValHisValAsnPro
 GlyAspGlyThrGlyLeuArgLysAlaLeuLeuHisAlaProThrGlyThrCysSerAsp
 GlyGlnAlaHisSerIleSerLeuValArgAsnArgArgIleIleThrValGlnLeuAsp
 GluAsnAsnProValGluMetLysLeuGlyThrLeuValGluSerArgThrIleAsnVal
 SerAsnLeuTyrValGlyGlyIleProGluGlyGluGlyThrSerLeuLeuThrMetArg
 ArgSerPheHisGlyCysIleLysAsnLeuIlePheAsnLeuGluLeuLeuAspPheAsn
 SerAlaValGlyHisGluGlnValAspLeuAspThrCysTrpLeuSerGluArgProLys
 LeuAlaProAspAlaGluAspSerLysLeuLeuProGluProArgAlaPheProGluGln
 CysValValAspAlaAlaLeuGluTyrValProGlyAlaHisGlnPheGlyLeuThrGln
 AsnSerHisPhelleLeuProPheAsnGlnSerAlaValArgLysLysLeuSerValGlu
 LeuSerIleArgThrPheAlaSerSerGlyLeuIleTyrTyrMetAlaHisGlnAsnGln
 AlaAspTyrAlaValLeuGlnLeuHisGlyGlyArgLeuHisPheMetPheAspLeuGly
 LysGlyArgThrLysValSerHisProAlaLeuLeuSerAspGlyLysTrpHisThrVal
 LysThrAspTyrValLysArgLysGlyPhelleThrValAspGlyArgGluSerProMet
 ValThrValValGlyAspGlyThrMetLeuAspValGluGlyLeuPheTyrLeuGlyGly
 LeuProSerGlnTyrGlnAlaArgLysIleGlyAsnIleThrHisSerIleProAlaCys
 IleGlyAspValThrValAsnSerLysGlnLeuAspLysAspSerProValSerAlaPhe
 ThrValAsnArgCysTyrAlaValAlaGlnGluGlyThrTyrPheAspGlySerGlyTyr
 AlaAlaLeuValLysGluGlyTyrLysValGlnSerAspValAsnIleThrLeuGluPhe
 ArgThrSerSerGlnAsnGlyValLeuLeuGlyIleSerThrAlaLysValAspAlaIle
 GlyLeuGluLeuValAspGlyLysValLeuPheHisValAsnAsnGlyAlaGlyArgIle
 ThrAlaAlaTyrGluProLysThrAlaThrValLeuCysAspGlyLysTrpHisThrLeu
 GlnAlaAsnLysSerLysHisArgIleThrLeuIleValAspGlyAsnAlaValGlyAla
 GluSerProHisThrGlnSerThrSerValAspThrAsnAsnProlleTyrValGlyGly
 TyrProAlaGlyValLysGlnLysCysLeuArgSerGlnThrSerPheArgGlyCysLeu
 ArgLysLeuAlaLeuIleLysSerProGlnValGlnSerPheAspPheSerArgAlaPhe
 GluLeuHisGlyValPheLeuHisSerCysProGlyThrGluSer

5 SEQ ID No. 2: Cadena alfa 2 de la laminina humana

MetProGlyAlaAlaGlyValLeuLeuLeuLeuLeuLeuSerGlyGlyLeuGlyGlyVal
 GlnAlaGlnArgProGlnGlnGlnArgGlnSerGlnAlaHisGlnGlnArgGlyLeuPhe
 ProAlaValLeuAsnLeuAlaSerAsnAlaLeulleThrThrAsnAlaThrCysGlyGlu
 LysGlyProGluMetTyrCysLysLeuValGluHisValProGlyGlnProValArgAsn
 ProGlnCysArgIleCysAsnGlnAsnSerSerAsnProAsnGlnArgHisProlleThr
 AsnAlalleAspGlyLysAsnThrTrpTrpGlnSerProSerIleLysAsnGlylleGlu
 TyrHisTyrValThrIleThrLeuAspLeuGlnGlnValPheGlnIleAlaTyrVallle
 VallysAlaAlaAsnSerProArgProGlyAsnTrpIleLeuGluArgSerLeuAspAsp
 ValGluTyrLysProTrpGlnTyrHisAlaValThrAspThrGluCysLeuThrLeuTyr
 AsnIleTyrProArgThrGlyProProSerTyrAlaLysAspAspGluVallleCysThr
 SerPheTyrSerLysIleHisProLeuGluAsnGlyGlulleHisIleSerLeulleAsn
 GlyArgProSerAlaAspAspProSerProGluLeuLeuGluPheThrSerAlaArgTyr
 IleArgLeuArgPheGlnArgIleArgThrLeuAsnAlaAspLeuMetMetPheAlaHis
 LysAspProArgGlulleAspProlleValThrArgArgTyrTyrTyrSerVallysAsp
 IleSerValGlyGlyMetCysIleCysTyrGlyHisAlaArgAlaCysProLeuAspPro
 AlaThrAsnLysSerArgCysGluCysGluHisAsnThrCysGlyAspSerCysAspGln
 CysCysProGlyPheHisGlnLysProTrpArgAlaGlyThrPheLeuThrLysThrGlu
 CysGluAlaCysAsnCysHisGlyLysAlaGluGluCysTyrTyrAspGluAsnValAla
 ArgArgAsnLeuSerLeuAsnIleArgGlyLysTyrIleGlyGlyGlyValCysIleAsn
 CysThrGlnAsnThrAlaGlylleAsnCysGluThrCysThrAspGlyPhePheArgPro
 LysGlyValSerProAsnTyrProArgProCysGlnProCysHisCysAspProlleGly
 SerLeuAsnGluValCysValLysAspGluLysHisAlaArgArgGlyLeuAlaProGly
 SerCysHisCysLysThrGlyPheGlyGlyValSerCysAspArgCysAlaArgGlyTyr
 ThrGlyTyrProAspCysLysAlaCysAsnCysSerGlyLeuGlySerLysAsnGluAsp
 ProCysPheGlyProCysIleCysLysGluAsnValGluGlyGlyAspCysSerArgCys

LysSerGlyPhePheAsnLeuGlnGluAspAsnTrpLysGlyCysAspGluCysPheCys
 SerGlyValSerAsnArgCysGlnSerSerTyrTrpThrTyrGlyLysIleGlnAspMet
 SerGlyTrpTyrLeuThrAspLeuProGlyArgIleArgValAlaProGlnGlnAspAsp
 LeuAspSerProGlnGlnIleSerIleSerAsnAlaGluAlaArgGlnAlaLeuProHis
 SerTyrTyrTrpSerAlaProAlaProTyrLeuGlyAsnLysLeuProAlaValGlyGly
 GlnLeuThrPheThrIleSerTyrAspLeuGluGluGluGluGluAspThrGluArgVal
 LeuGlnLeuMetIleIleLeuGluGlyAsnAspLeuSerIleSerThrAlaGlnAspGlu
 ValTyrLeuHisProSerGluGluHisThrAsnValLeuLeuLeuLysGluGluSerPhe
 ThrIleHisGlyThrHisPheProValArgArgLysGluPheMetThrValLeuAlaAsn
 LeuLysArgValLeuLeuGlnIleThrTyrSerPheGlyMetAspAlaIlePheArgLeu
 SerSerValAsnLeuGluSerAlaValSerTyrProThrAspGlySerIleAlaAlaAla
 ValGluValCysGlnCysProProGlyTyrThrGlySerSerCysGluSerCysTrpPro
 ArgHisArgArgValAsnGlyThrIlePheGlyGlyIleCysGluProCysGlnCysPhe
 GlyHisAlaGluSerCysAspAspValThrGlyGluCysLeuAsnCysLysAspHisThr
 GlyGlyProTyrCysAspLysCysLeuProGlyPheTyrGlyGluProThrLysGlyThr
 SerGluAspCysGlnProCysAlaCysProLeuAsnIleProSerAsnAsnPheSerPro
 ThrCysHisLeuAspArgSerLeuGlyLeuIleCysAspGlyCysProValGlyTyrThr
 GlyProArgCysGluArgCysAlaGluGlyTyrPheGlyGlnProSerValProGlyGly
 SerCysGlnProCysGlnCysAsnAspAsnLeuAspPheSerIleProGlySerCysAsp
 SerLeuSerGlySerCysLeuIleCysLysProGlyThrThrGlyArgTyrCysGluLeu
 CysAlaAspGlyTyrPheGlyAspAlaValAspAlaLysAsnCysGlnProCysArgCys
 AsnAlaGlyGlySerPheSerGluValCysHisSerGlnThrGlyGlnCysGluCysArg
 AlaAsnValGlnGlyGlnArgCysAspLysCysLysAlaGlyThrPheGlyLeuGlnSer
 AlaArgGlyCysValProCysAsnCysAsnSerPheGlySerLysSerPheAspCysGlu
 GluSerGlyGlnCysTrpCysGlnProGlyValThrGlyLysLysCysAspArgCysAla
 HisGlyTyrPheAsnPheGlnGluGlyGlyCysThrAlaCysGluCysSerHisLeuGly
 AsnAsnCysAspProLysThrGlyArgCysIleCysProProAsnThrIleGlyGluLys
 CysSerLysCysAlaProAsnThrTrpGlyHisSerIleThrThrGlyCysLysAlaCys
 AsnCysSerThrValGlySerLeuAspPheGlnCysAsnValAsnThrGlyGlnCysAsn
 CysHisProLysPheSerGlyAlaLysCysThrGluCysSerArgGlyHisTrpAsnTyr
 ProArgCysAsnLeuCysAspCysPheLeuProGlyThrAspAlaThrThrCysAspSer

GluThrLysLysCysSerCysSerAspGlnThrGlyGlnCysThrCysLysValAsnVal
 GluGlylleHisCysAspArgCysArgProGlyLysPheGlyLeuAspAlaLysAsnPro
 LeuGlyCysSerSerCysTyrCysPheGlyThrThrThrGlnCysSerGluAlaLysGly
 LeulleArgThrTrpValThrLeuLysAlaGluGlnThrIleLeuProLeuValAspGlu
 AlaLeuGlnHisThrThrThrLysGlylleValPheGlnHisProGluIleValAlaHis
 MetAspLeuMetArgGluAspLeuHisLeuGluProPheTyrTrpLysLeuProGluGln
 PheGluGlyLysLysLeuMetAlaTyrGlyGlyLysLeuLysTyrAlaIleTyrPheGlu
 AlaArgGluGluThrGlyPheSerThrTyrAsnProGlnValIleIleArgGlyGlyThr
 ProThrHisAlaArgIleIleValArgHisMetAlaAlaProLeulleGlyGlnLeuThr
 ArgHisGluIleGluMetThrGluLysGluTrpLysTyrTyrGlyAspAspProArgVal
 HisArgThrValThrArgGluAspPheLeuAspIleLeuTyrAspIleHisTyrIleLeu
 IleLysAlaThrTyrGlyAsnPheMetArgGlnSerArgIleSerGluIleSerMetGlu
 ValAlaGluGlnGlyArgGlyThrThrMetThrProProAlaAspLeulleGluLysCys
 AspCysProLeuGlyTyrSerGlyLeuSerCysGluAlaCysLeuProGlyPheTyrArg
 LeuArgSerGlnProGlyGlyArgThrProGlyProThrLeuGlyThrCysValProCys
 GlnCysAsnGlyHisSerSerLeuCysAspProGluThrSerIleCysGlnAsnCysGln
 HisHisThrAlaGlyAspPheCysGluArgCysAlaLeuGlyTyrTyrGlylleValLys
 GlyLeuProAsnAspCysGlnGlnCysAlaCysProLeulleSerSerSerAsnAsnPhe
 SerProSerCysValAlaGluGlyLeuAspAspTyrArgCysThrAlaCysProArgGly
 TyrGluGlyGlnTyrCysGluArgCysAlaProGlyTyrThrGlySerProGlyAsnPro
 GlyGlySerCysGlnGluCysGluCysAspProTyrGlySerLeuProValProCysAsp
 ProValThrGlyPheCysThrCysArgProGlyAlaThrGlyArgLysCysAspGlyCys
 LysHisTrpHisAlaArgGluGlyTrpGluCysValPheCysGlyAspGluCysThrGly
 LeuLeuLeuGlyAspLeuAlaArgLeuGluGlnMetValMetSerIleAsnLeuThrGly
 ProLeuProAlaProTyrLysMetLeuTyrGlyLeuGluAsnMetThrGlnGluLeuLys
 HisLeuLeuSerProGlnArgAlaProGluArgLeulleGlnLeuAlaGluGlyAsnLeu
 AsnThrLeuValThrGluMetAsnGluLeuLeuThrArgAlaThrLysValThrAlaAsp
 GlyGluGlnThrGlyGlnAspAlaGluArgThrAsnThrArgAlaLysSerLeuGlyGlu
 PheIleLysGluLeuAlaArgAspAlaGluAlaValAsnGluLysAlaIleLysLeuAsn
 GluThrLeuGlyThrArgAspGluAlaPheGluArgAsnLeuGluGlyLeuGlnLysGlu
 IleAspGlnMetIleLysGluLeuArgArgLysAsnLeuGluThrGlnLysGluIleAla

GluAspGluLeuValAlaAlaGluAlaLeuLeuLysLysValLysLysLeuPheGlyGlu
 SerArgGlyGluAsnGluGluMetGluLysAspLeuArgGluLysLeuAlaAspTyrLys
 AsnLysValAspAspAlaTrpAspLeuLeuArgGluAlaThrAspLysIleArgGluAla
 AsnArgLeuPheAlaValAsnGlnLysAsnMetThrAlaLeuGluLysLysLysGluAla
 ValGluSerGlyLysArgGlnIleGluAsnThrLeuLysGluGlyAsnAspIleLeuAsp
 GluAlaAsnArgLeuAlaAspGluIleAsnSerIleIleAspTyrValGluAspIleGln
 ThrLysLeuProProMetSerGluGluLeuAsnAspLysIleAspAspLeuSerGlnGlu
 IleLysAspArgLysLeuAlaGluLysValSerGlnAlaGluSerHisAlaAlaGlnLeu
 AsnAspSerSerAlaValLeuAspGlyIleLeuAspGluAlaLysAsnIleSerPheAsn
 AlaThrAlaAlaPheLysAlaTyrSerAsnIleLysAspTyrIleAspGluAlaGluLys
 ValAlaLysGluAlaLysAspLeuAlaHisGluAlaThrLysLeuAlaThrGlyProArg
 GlyLeuLeuLysGluAspAlaLysGlyCysLeuGlnLysSerPheArgIleLeuAsnGlu
 AlaLysLysLeuAlaAsnAspValLysGluAsnGluAspHisLeuAsnGlyLeuLysThr
 ArgIleGluAsnAlaAspAlaArgAsnGlyAspLeuLeuArgThrLeuAsnAspThrLeu
 GlyLysLeuSerAlaIleProAsnAspThrAlaAlaLysLeuGlnAlaValLysAspLys
 AlaArgGlnAlaAsnAspThrAlaLysAspValLeuAlaGlnIleThrGluLeuHisGln
 AsnLeuAspGlyLeuLysLysAsnTyrAsnLysLeuAlaAspSerValAlaLysThrAsn
 AlaValValLysAspProSerLysAsnLysIleIleAlaAspAlaAspAlaThrValLys
 AsnLeuGluGlnGluAlaAspArgLeuIleAspLysLeuLysProlleLysGluLeuGlu
 AspAsnLeuLysLysAsnIleSerGluIleLysGluLeuIleAsnGlnAlaArgLysGln
 AlaAsnSerIleLysValSerValSerSerGlyGlyAspCysIleArgThrTyrLysPro
 GluIleLysLysGlySerTyrAsnAsnIleValValAsnValLysThrAlaValAlaAsp
 AsnLeuLeuPheTyrLeuGlySerAlaLysPhelleAspPheLeuAlaIleGluMetArg
 LysGlyLysValSerPheLeuTrpAspValGlySerGlyValGlyArgValGluTyrPro
 AspLeuThrIleAspAspSerTyrTrpTyrArgIleValAlaSerArgThrGlyArgAsn
 GlyThrIleSerValArgAlaLeuAspGlyProLysAlaSerIleValProSerThrHis
 HisSerThrSerProProGlyTyrThrIleLeuAspValAspAlaAsnAlaMetLeuPhe
 ValGlyGlyLeuThrGlyLysLeuLysLysAlaAspAlaValArgValIleThrPheThr
 GlyCysMetGlyGluThrTyrPheAspAsnLysProlleGlyLeuTrpAsnPheArgGlu
 LysGluGlyAspCysLysGlyCysThrValSerProGlnValGluAspSerGluGlyThr
 IleGlnPheAspGlyGluGlyTyrAlaLeuValSerArgProlleArgTrpTyrProAsn

IleSerThrValMetPheLysPheArgThrPheSerSerSerAlaLeuLeuMetTyrLeu
 AlaThrArgAspLeuArgAspPheMetSerValGluLeuThrAspGlyHisIleLysVal
 SerTyrAspLeuGlySerGlyMetAlaSerValValSerAsnGlnAsnHisAsnAspGly
 LysTrpLysSerPheThrLeuSerArgIleGlnLysGlnAlaAsnIleSerIleValAsp
 IleAspThrAsnGlnGluGluAsnIleAlaThrSerSerSerGlyAsnAsnPheGlyLeu
 AspLeuLysAlaAspAspLysIleTyrPheGlyGlyLeuProThrLeuArgAsnLeuSer
 MetLysAlaArgProGluValAsnLeuLysLysTyrSerGlyCysLeuLysAspIleGlu
 IleSerArgThrProTyrAsnIleLeuSerSerProAspTyrValGlyValThrLysGly
 CysSerLeuGluAsnValTyrThrValSerPheProLysProGlyPheValGluLeuSer
 ProValProIleAspValGlyThrGluIleAsnLeuSerPheSerThrLysAsnGluSer
 GlyIleIleLeuLeuGlySerGlyGlyThrProAlaProProArgArgLysArgArgGln
 ThrGlyGlnAlaTyrTyrValIleLeuLeuAsnArgGlyArgLeuGluValHisLeuSer
 ThrGlyAlaArgThrMetArgLysIleValIleArgProGluProAsnLeuPheHisAsp
 GlyArgGluHisSerValHisValGluArgThrArgGlyIlePheThrValGlnValAsp
 GluAsnArgArgTyrMetGlnAsnLeuThrValGluGlnProIleGluValLysLysLeu
 PheValGlyGlyAlaProProGluPheGlnProSerProLeuArgAsnIleProProPhe
 GluGlyCysIleTrpAsnLeuValIleAsnSerValProMetAspPheAlaArgProVal
 SerPheLysAsnAlaAspIleGlyArgCysAlaHisGlnLysLeuArgGluAspGluAsp
 GlyAlaAlaProAlaGluIleValIleGlnProGluProValProThrProAlaPhePro
 ThrProThrProValLeuThrHisGlyProCysAlaAlaGluSerGluProAlaLeuLeu
 IleGlySerLysGlnPheGlyLeuSerArgAsnSerHisIleAlaIleAlaPheAspAsp
 ThrLysValLysAsnArgLeuThrIleGluLeuGluValArgThrGluAlaGluSerGly
 LeuLeuPheTyrMetAlaArgIleAsnHisAlaAspPheAlaThrValGlnLeuArgAsn
 GlyLeuProTyrPheSerTyrAspLeuGlySerGlyAspThrHisThrMetIleProThr
 LysIleAsnAspGlyGlnTrpHisLysIleLysIleMetArgSerLysGlnGluGlyIle
 LeuTyrValAspGlyAlaSerAsnArgThrIleSerProLysLysAlaAspIleLeuAsp
 ValValGlyMetLeuTyrValGlyGlyLeuProIleAsnTyrThrThrArgArgIleGly
 ProValThrTyrSerIleAspGlyCysValArgAsnLeuHisMetAlaGluAlaProAla
 AspLeuGluGlnProThrSerSerPheHisValGlyThrCysPheAlaAsnAlaGlnArg
 GlyThrTyrPheAspGlyThrGlyPheAlaLysAlaValGlyGlyPheLysValGlyLeu
 AspLeuLeuValGluPheGluPheArgThrThrThrThrThrGlyValLeuLeuGlyIle
 SerSerGlnLysMetAspGlyMetGlyIleGluMetIleAspGluLysLeuMetPheHis
 ValAspAsnGlyAlaGlyArgPheThrAlaValTyrAspAlaGlyValProGlyHisLeu
 CysAspGlyGlnTrpHisLysValThrAlaAsnLysIleLysHisArgIleGluLeuThr
 ValAspGlyAsnGlnValGluAlaGlnSerProAsnProAlaSerThrSerAlaAspThr
 AsnAspProValPheValGlyGlyPheProAspAspLeuLysGlnPheGlyLeuThrThr
 SerIleProPheArgGlyCysIleArgSerLeuLysLeuThrLysGlyThrGlyLysPro
 LeuGluValAsnPheAlaLysAlaLeuGluLeuArgGlyValGlnProValSerCysPro
 AlaAsn

SEQ ID No. 3: Cadena alfa 5 de la laminina humana

MetAlaLysArgLeuCysAlaGlySerAlaLeuCysValArgGlyProArgGlyProAla
 ProLeuLeuLeuValGlyLeuAlaLeuLeuGlyAlaAlaArgAlaArgGluGluAlaGly
 GlyGlyPheSerLeuHisProProTyrPheAsnLeuAlaGluGlyAlaArgIleAlaAla
 SerAlaThrCysGlyGluGluAlaProAlaArgGlySerProArgProThrGluAspLeu
 TyrCysLysLeuValGlyGlyProValAlaGlyGlyAspProAsnGlnThrIleArgGly
 GlnTyrCysAspIleCysThrAlaAlaAsnSerAsnLysAlaHisProAlaSerAsnAla
 IleAspGlyThrGluArgTrpTrpGlnSerProProLeuSerArgGlyLeuGluTyrAsn
 GluValAsnValThrLeuAspLeuGlyGlnValPheHisValAlaTyrValLeuIleLys
 PheAlaAsnSerProArgProAspLeuTrpValLeuGluArgSerMetAspPheGlyArg
 ThrTyrGlnProTrpGlnPhePheAlaSerSerLysArgAspCysLeuGluArgPheGly
 ProGlnThrLeuGluArgIleThrArgAspAspAlaAlaIleCysThrThrGluTyrSer
 ArgIleValProLeuGluAsnGlyGluIleValValSerLeuValAsnGlyArgProGly
 AlaMetAsnPheSerTyrSerProLeuLeuArgGluPheThrLysAlaThrAsnValArg
 LeuArgPheLeuArgThrAsnThrLeuLeuGlyHisLeuMetGlyLysAlaLeuArgAsp
 ProThrValThrArgArgTyrTyrTyrSerIleLysAspIleSerIleGlyGlyArgCys
 ValCysHisGlyHisAlaAspAlaCysAspAlaLysAspProThrAspProPheArgLeu
 GlnCysThrCysGlnHisAsnThrCysGlyGlyThrCysAspArgCysCysProGlyPhe
 AsnGlnGlnProTrpLysProAlaThrAlaAsnSerAlaAsnGluCysGlnSerCysAsn
 CysTyrGlyHisAlaThrAspCysTyrTyrAspProGluValAspArgArgArgAlaSer
 GlnSerLeuAspGlyThrTyrGlnGlyGlyGlyValCysIleAspCysGlnHisHisThr

ThrGlyValAsnCysGluArgCysLeuProGlyPheTyrArgSerProAsnHisProLeu
 AspSerProHisValCysArgArgCysAsnCysGluSerAspPheThrAspGlyThrCys
 GluAspLeuThrGlyArgCysTyrCysArgProAsnPheSerGlyGluArgCysAspVal
 CysAlaGluGlyPheThrGlyPheProSerCysTyrProThrProSerSerSerAsnAsp
 ThrArgGluGlnValLeuProAlaGlyGlnIleValAsnCysAspCysSerAlaAlaGly
 ThrGlnGlyAsnAlaCysArgLysAspProArgValGlyArgCysLeuCysLysProAsn
 PheGlnGlyThrHisCysGluLeuCysAlaProGlyPheTyrGlyProGlyCysGlnPro
 CysGlnCysSerSerProGlyValAlaAspAspArgCysAspProAspThrGlyGlnCys
 ArgCysArgValGlyPheGluGlyAlaThrCysAspArgCysAlaProGlyTyrPheHis
 PheProLeuCysGlnLeuCysGlyCysSerProAlaGlyThrLeuProGluGlyCysAsp
 GluAlaGlyArgCysLeuCysGlnProGluPheAlaGlyProHisCysAspArgCysArg
 ProGlyTyrHisGlyPheProAsnCysGlnAlaCysThrCysAspProArgGlyAlaLeu
 AspGlnLeuCysGlyAlaGlyGlyLeuCysArgCysArgProGlyTyrThrGlyThrAla
 CysGlnGluCysSerProGlyPheHisGlyPheProSerCysValProCysHisCysSer
 AlaGluGlySerLeuHisAlaAlaCysAspProArgSerGlyGlnCysSerCysArgPro
 ArgValThrGlyLeuArgCysAspThrCysValProGlyAlaTyrAsnPheProTyrCys
 GluAlaGlySerCysHisProAlaGlyLeuAlaProValAspProAlaLeuProGluAla
 GlnValProCysMetCysArgAlaHisValGluGlyProSerCysAspArgCysLysPro
 GlyPheTrpGlyLeuSerProSerAsnProGluGlyCysThrArgCysSerCysAspLeu
 ArgGlyThrLeuGlyGlyValAlaGluCysGlnProGlyThrGlyGlnCysPheCysLys
 ProHisValCysGlyGlnAlaCysAlaSerCysLysAspGlyPhePheGlyLeuAspGln
 AlaAspTyrPheGlyCysArgSerCysArgCysAspIleGlyGlyAlaLeuGlyGlnSer
 CysGluProArgThrGlyValCysArgCysArgProAsnThrGlnGlyProThrCysSer
 GluProAlaArgAspHisTyrLeuProAspLeuHisHisLeuArgLeuGluLeuGluGlu
 AlaAlaThrProGluGlyHisAlaValArgPheGlyPheAsnProLeuGluPheGluAsn
 PheSerTrpArgGlyTyrAlaGlnMetAlaProValGlnProArgIleValAlaArgLeu
 AsnLeuThrSerProAspLeuPheTrpLeuValPheArgTyrValAsnArgGlyAlaMet
 SerValSerGlyArgValSerValArgGluGluGlyArgSerAlaThrCysAlaAsnCys
 ThrAlaGlnSerGlnProValAlaPheProProSerThrGluProAlaPhelleThrVal
 ProGlnArgGlyPheGlyGluProPheValLeuAsnProGlyThrTrpAlaLeuArgVal
 GluAlaGluGlyValLeuLeuAspTyrValValLeuLeuProSerAlaTyrTyrGluAla

AlaLeuLeuGlnLeuArgValThrGluAlaCysThrTyrArgProSerAlaGlnGlnSer
 GlyAspAsnCysLeuLeuTyrThrHisLeuProLeuAspGlyPheProSerAlaAlaGly
 LeuGluAlaLeuCysArgGlnAspAsnSerLeuProArgProCysProThrGluGlnLeu
 SerProSerHisProProLeulleThrCysThrGlySerAspValAspValGlnLeuGln
 ValAlaValProGlnProGlyArgTyrAlaLeuValValGluTyrAlaAsnGluAspAla
 ArgGlnGluValGlyValAlaValHisThrProGlnArgAlaProGlnGlnGlyLeuLeu
 SerLeuHisProCysLeuTyrSerThrLeuCysArgGlyThrAlaArgAspThrGlnAsp
 HisLeuAlaValPheHisLeuAspSerGluAlaSerValArgLeuThrAlaGluGlnAla
 ArgPhePheLeuHisGlyValThrLeuValProlleGluGluPheSerProGluPheVal
 GluProArgValSerCyslleSerSerHisGlyAlaPheGlyProAsnSerAlaAlaCys
 LeuProSerArgPheProLysProProGlnProllelleLeuArgAspCysGlnVallle
 ProLeuProProGlyLeuProLeuThrHisAlaGlnAspLeuThrProAlaMetSerPro
 AlaGlyProArgProArgProProThrAlaValAspProAspAlaGluProThrLeuLeu
 ArgGluProGlnAlaThrValValPheThrThrHisValProThrLeuGlyArgTyrAla
 PheLeuLeuHisGlyTyrGlnProAlaHisProThrPheProValGluValLeulleAsn
 AlaGlyArgValTrpGlnGlyHisAlaAsnAlaSerPheCysProHisGlyTyrGlyCys
 ArgThrLeuValValCysGluGlyGlnAlaLeuLeuAspValThrHisSerGluLeuThr
 ValThrValArgValProLysGlyArgTrpLeuTrpLeuAspTyrValLeuValValPro
 GluAsnValTyrSerPheGlyTyrLeuArgGluGluProLeuAspLysSerTyrAspPhe
 lleSerHisCysAlaAlaGlnGlyTyrHislleSerProSerSerSerSerLeuPheCys
 ArgAsnAlaAlaAlaSerLeuSerLeuPheTyrAsnAsnGlyAlaArgProCysGlyCys
 HisGluValGlyAlaThrGlyProThrCysGluProPheGlyGlyGlnCysProCysHis
 AlaHisVallleGlyArgAspCysSerArgCysAlaThrGlyTyrTrpGlyPheProAsn
 CysArgProCysAspCysGlyAlaArgLeuCysAspGluLeuThrGlyGlnCyslleCys
 ProProArgThrilleProProAspCysLeuLeuCysGlnProGlnThrPheGlyCysHis
 ProLeuValGlyCysGluGluCysAsnCysSerGlyProGlylleGlnGluLeuThrAsp
 ProThrCysAspThrAspSerGlyGlnCysLysCysArgProAsnValThrGlyArgArg
 CysAspThrCysSerProGlyPheHisGlyTyrProArgCysArgProCysAspCysHis
 GluAlaGlyThrAlaProGlyValCysAspProLeuThrGlyGlnCysTyrCysLysGlu
 AsnValGlnGlyProLysCysAspGlnCysSerLeuGlyThrPheSerLeuAspAlaAla
 AsnProLysGlyCysThrArgCysPheCysPheGlyAlaThrGluArgCysArgSerSer

SerTyrThrArgGlnGluPheValAspMetGluGlyTrpValLeuLeuSerThrAspArg
 GlnValValProHisGluArgGlnProGlyThrGluMetLeuArgAlaAspLeuArgHis
 ValProGluAlaValProGluAlaPheProGluLeuTyrTrpGlnAlaProProSerTyr
 LeuGlyAspArgValSerSerTyrGlyGlyThrLeuArgTyrGluLeuHisSerGluThr
 GlnArgGlyAspValPheValProMetGluSerArgProAspValValLeuGlnGlyAsn
 GlnMetSerIleThrPheLeuGluProAlaTyrProThrProGlyHisValHisArgGly
 GlnLeuGlnLeuValGluGlyAsnPheArgHisThrGluThrArgAsnThrValSerArg
 GluGluLeuMetMetValLeuAlaSerLeuGluGlnLeuGlnIleArgAlaLeuPheSer
 GlnIleSerSerAlaValPheLeuArgArgValAlaLeuGluValAlaSerProAlaGly
 GlnGlyAlaLeuAlaSerAsnValGluLeuCysLeuCysProAlaSerTyrArgGlyAsp
 SerCysGlnGluCysAlaProGlyPheTyrArgAspValLysGlyLeuPheLeuGlyArg
 CysValProCysGlnCysHisGlyHisSerAspArgCysLeuProGlySerGlyValCys
 ValAspCysGlnHisAsnThrGluGlyAlaHisCysGluArgCysGlnAlaGlyPheVal
 SerSerArgAspAspProSerAlaProCysValSerCysProCysProLeuSerValPro
 SerAsnAsnPheAlaGluGlyCysValLeuArgGlyGlyArgThrGlnCysLeuCysLys
 ProGlyTyrAlaGlyAlaSerCysGluArgCysAlaProGlyPhePheGlyAsnProLeu
 ValLeuGlySerSerCysGlnProCysAspCysSerGlyAsnGlyAspProAsnLeuLeu
 PheSerAspCysAspProLeuThrGlyAlaCysArgGlyCysLeuArgHisThrThrGly
 ProArgCysGluIleCysAlaProGlyPheTyrGlyAsnAlaLeuLeuProGlyAsnCys
 ThrArgCysAspCysThrProCysGlyThrGluAlaCysAspProHisSerGlyHisCys
 LeuCysLysAlaGlyValThrGlyArgArgCysAspArgCysGlnGluGlyHisPheGly
 PheAspGlyCysGlyGlyCysArgProCysAlaCysGlyProAlaAlaGluGlySerGlu
 CysHisProGlnSerGlyGlnCysHisCysArgProGlyThrMetGlyProGlnCysArg
 GluCysAlaProGlyTyrTrpGlyLeuProGluGlnGlyCysArgArgCysGlnCysPro
 GlyGlyArgCysAspProHisThrGlyArgCysAsnCysProProGlyLeuSerGlyGlu
 ArgCysAspThrCysSerGlnGlnHisGlnValProValProGlyGlyProValGlyHis
 SerIleHisCysGluValCysAspHisCysValValLeuLeuLeuAspAspLeuGluArg
 AlaGlyAlaLeuLeuProAlaIleHisGluGlnLeuArgGlyIleAsnAlaSerSerMet
 AlaTrpAlaArgLeuHisArgLeuAsnAlaSerIleAlaAspLeuGlnSerGlnLeuArg
 SerProLeuGlyProArgHisGluThrAlaGlnGlnLeuGluValLeuGluGlnGlnSer
 ThrSerLeuGlyGlnAspAlaArgArgLeuGlyGlyGlnAlaValGlyThrArgAspGln

AlaSerGlnLeuLeuAlaGlyThrGluAlaThrLeuGlyHisAlaLysThrLeuLeuAla
 AlalleArgAlaValAspArgThrLeuSerGluLeuMetSerGlnThrGlyHisLeuGly
 LeuAlaAsnAlaSerAlaProSerGlyGluGlnLeuLeuArgThrLeuAlaGluValGlu
 ArgLeuLeuTrpGluMetArgAlaArgAspLeuGlyAlaProGlnAlaAlaAlaGluAla
 GluLeuAlaAlaAlaGlnArgLeuLeuAlaArgValGlnGluGlnLeuSerSerLeuTrp
 GluGluAsnGlnAlaLeuAlaThrGlnThrArgAspArgLeuAlaGlnHisGluAlaGly
 LeuMetAspLeuArgGluAlaLeuAsnArgAlaValAspAlaThrArgGluAlaGlnGlu
 LeuAsnSerArgAsnGlnGluArgLeuGluGluAlaLeuGlnArgLysGlnGluLeuSer
 ArgAspAsnAlaThrLeuGlnAlaThrLeuHisAlaAlaArgAspThrLeuAlaSerVal
 PheArgLeuLeuHisSerLeuAspGlnAlaLysGluGluLeuGluArgLeuAlaAlaSer
 LeuAspGlyAlaArgThrProLeuLeuGlnArgMetGlnThrPheSerProAlaGlySer
 LysLeuArgLeuValGluAlaAlaGluAlaHisAlaGlnGlnLeuGlyGlnLeuAlaLeu
 AsnLeuSerSerIleLeuAspValAsnGlnAspArgLeuThrGlnArgAlalleGlu
 AlaSerAsnAlaTyrSerArgIleLeuGlnAlaValGlnAlaAlaGluAspAlaAlaGly
 GlnAlaLeuGlnGlnAlaAspHisThrTrpAlaThrValValArgGlnGlyLeuValAsp
 ArgAlaGlnGlnLeuLeuAlaAsnSerThrAlaLeuGluGluAlaMetLeuGlnGluGln
 GlnArgLeuGlyLeuValTrpAlaAlaLeuGlnGlyAlaArgThrGlnLeuArgAspVal
 ArgAlaLysLysAspGlnLeuGluAlaHisIleGlnAlaAlaGlnAlaMetLeuAlaMet
 AspThrAspGluThrSerLysLysIleAlaHisAlaLysAlaValAlaAlaGluAlaGln
 AspThrAlaThrArgValGlnSerGlnLeuGlnAlaMetGlnGluAsnValGluArgTrp
 GlnGlyGlnTyrGluGlyLeuArgGlyGlnAspLeuGlyGlnAlaValLeuAspAlaGly
 HisSerValSerThrLeuGluLysThrLeuProGlnLeuLeuAlaLysLeuSerIleLeu
 GluAsnArgGlyValHisAsnAlaSerLeuAlaLeuSerAlaSerIleGlyArgValArg
 GluLeuIleAlaGlnAlaArgGlyAlaAlaSerLysValLysValProMetLysPheAsn
 GlyArgSerGlyValGlnLeuArgThrProArgAspLeuAlaAspLeuAlaAlaTyrThr
 AlaLeuLysPheTyrLeuGlnGlyProGluProGluProGlyGlnGlyThrGluAspArg
 PheValMetTyrMetGlySerArgGlnAlaThrGlyAspTyrMetGlyValSerLeuArg
 AspLysLysValHisTrpValTyrGlnLeuGlyGluAlaGlyProAlaValLeuSerIle
 AspGluAspIleGlyGluGlnPheAlaAlaValSerLeuAspArgThrLeuGlnPheGly
 HisMetSerValThrValGluArgGlnMetIleGlnGluThrLysGlyAspThrValAla
 ProGlyAlaGluGlyLeuLeuAsnLeuArgProAspAspPheValPheTyrValGlyGly

TyrProSerThrPheThrProProProLeuLeuArgPheProGlyTyrArgGlyCysIle
 GluMetAspThrLeuAsnGluGluValValSerLeuTyrAsnPheGluArgThrPheGln
 LeuAspThrAlaValAspArgProCysAlaArgSerLysSerThrGlyAspProTrpLeu
 ThrAspGlySerTyrLeuAspGlyThrGlyPheAlaArgIleSerPheAspSerGlnIle
 SerThrThrLysArgPheGluGlnGluLeuArgLeuValSerTyrSerGlyValLeuPhe
 PheLeuLysGlnGlnSerGlnPheLeuCysLeuAlaValGlnGluGlySerLeuValLeu
 LeuTyrAspPheGlyAlaGlyLeuLysLysAlaValProLeuGlnProProProProLeu
 ThrSerAlaSerLysAlaIleGlnValPheLeuLeuGlyGlySerArgLysArgValLeu
 ValArgValGluArgAlaThrValTyrSerValGluGlnAspAsnAspLeuGluLeuAla
 AspAlaTyrTyrLeuGlyGlyValProProAspGlnLeuProProSerLeuArgArgLeu
 PheProThrGlyGlySerValArgGlyCysValLysGlyIleLysAlaLeuGlyLysTyr
 ValAspLeuLysArgLeuAsnThrThrGlyValSerAlaGlyCysThrAlaAspLeuLeu
 ValGlyArgAlaMetThrPheHisGlyHisGlyPheLeuArgLeuAlaLeuSerAsnVal
 AlaProLeuThrGlyAsnValTyrSerGlyPheGlyPheHisSerAlaGlnAspSerAla
 LeuLeuTyrTyrArgAlaSerProAspGlyLeuCysGlnValSerLeuGlnGlnGlyArg
 ValSerLeuGlnLeuLeuArgThrGluValLysThrGlnAlaGlyPheAlaAspGlyAla
 ProHisTyrValAlaPheTyrSerAsnAlaThrGlyValTrpLeuTyrValAspAspGln
 LeuGlnGlnMetLysProHisArgGlyProProProGluLeuGlnProGlnProGluGly
 ProProArgLeuLeuLeuGlyGlyLeuProGluSerGlyThrIleTyrAsnPheSerGly
 CysIleSerAsnValPheValGlnArgLeuLeuGlyProGlnArgValPheAspLeuGln
 GlnAsnLeuGlySerValAsnValSerThrGlyCysAlaProAlaLeuGlnAlaGlnThr
 ProGlyLeuGlyProArgGlyLeuGlnAlaThrAlaArgLysAlaSerArgArgSerArg
 GlnProAlaArgHisProAlaCysMetLeuProProHisLeuArgThrThrArgAspSer
 TyrGlnPheGlyGlySerLeuSerSerHisLeuGluPheValGlyIleLeuAlaArgHis
 ArgAsnTrpProSerLeuSerMetHisValLeuProArgSerSerArgGlyLeuLeuLeu
 PheThrAlaArgLeuArgProGlySerProSerLeuAlaLeuPheLeuSerAsnGlyHis
 PheValAlaGlnMetGluGlyLeuGlyThrArgLeuArgAlaGlnSerArgGlnArgSer
 ArgProGlyArgTrpHisLysValSerValArgTrpGluLysAsnArgIleLeuLeuVal
 ThrAspGlyAlaArgAlaTrpSerGlnGluGlyProHisArgGlnHisGlnGlyAlaGlu
 HisProGlnProHisThrLeuPheValGlyGlyLeuProAlaSerSerHisSerSerLys
 LeuProValThrValGlyPheSerGlyCysValLysArgLeuArgLeuHisGlyArgPro

LeuGlyAlaProThrArgMetAlaGlyValThrProCysIleLeuGlyProLeuGluAla
GlyLeuPhePheProGlySerGlyGlyValIleThrLeuAspLeuProGlyAlaThrLeu
ProAspValGlyLeuGluLeuGluValArgProLeuAlaValThrGlyLeullePheHis
LeuGlyGlnAlaArgThrProProTyrLeuGlnLeuGlnValThrGluLysGlnValLeu
LeuArgAlaAspAspGlyAlaGlyGluPheSerThrSerValThrArgProSerValLeu
CysAspGlyGlnTrpHisArgLeuAlaValMetLysSerGlyAsnValLeuArgLeuGlu
ValAspAlaGlnSerAsnHisThrValGlyProLeuLeuAlaAlaAlaAlaGlyAlaPro
AlaProLeuTyrLeuGlyGlyLeuProGluProMetAlaValGlnProTrpProProAla
TyrCysGlyCysMetArgArgLeuAlaValAsnArgSerProValAlaMetThrArgSer
ValGluValHisGlyAlaValGlyAlaSerGlyCysProAlaAla

SEQ ID No 4: Cadena beta 1 de la laminina humana

MetGlyLeuLeuGlnLeuLeuAlaPheSerPheLeuAlaLeuCysArgAlaArgValArg
AlaGlnGluProGluPheSerTyrGlyCysAlaGluGlySerCysTyrProAlaThrGly
AspLeuLeulleGlyArgAlaGlnLysLeuSerValThrSerThrCysGlyLeuHisLys
ProGluProTyrCysIleValSerHisLeuGlnGluAspLysLysCysPhelleCysAsn
SerGlnAspProTyrHisGluThrLeuAsnProAspSerHisLeulleGluAsnValVal
ThrThrPheAlaProAsnArgLeuLysIleTrpTrpGlnSerGluAsnGlyValGluAsn
ValThrIleGlnLeuAspLeuGluAlaGluPheHisPheThrHisLeulleMetThrPhe
LysThrPheArgProAlaAlaMetLeulleGluArgSerSerAspPheGlyLysThrTrp
GlyValTyrArgTyrPheAlaTyrAspCysGluAlaSerPheProGlyIleSerThrGly
ProMetLysLysValAspAspIlelleCysAspSerArgTyrSerAspIleGluProSer
ThrGluGlyGluValIlePheArgAlaLeuAspProAlaPheLysIleGluAspProTyr
SerProArgIleGlnAsnLeuLeuLysIleThrAsnLeuArgIleLysPheValLysLeu
HisThrLeuGlyAspAsnLeuLeuAspSerArgMetGluIleArgGluLysTyrTyrTyr
AlaValTyrAspMetValValArgGlyAsnCysPheCysTyrGlyHisAlaSerGluCys
AlaProValAspGlyPheAsnGluGluValGluGlyMetValHisGlyHisCysMetCys
ArgHisAsnThrLysGlyLeuAsnCysGluLeuCysMetAspPheTyrHisAspLeuPro
TrpArgProAlaGluGlyArgAsnSerAsnAlaCysLysLysCysAsnCysAsnGluHis
SerIleSerCysHisPheAspMetAlaValTyrLeuAlaThrGlyAsnValSerGlyGly

5

ValCysAspAspCysGlnHisAsnThrMetGlyArgAsnCysGluGlnCysLysProPhe
 TyrTyrGlnHisProGluArgAspIleArgAspProAsnPheCysGluArgCysThrCys
 AspProAlaGlySerGlnAsnGluGlyIleCysAspSerTyrThrAspPheSerThrGly
 LeuIleAlaGlyGlnCysArgCysLysLeuAsnValGluGlyGluHisCysAspValCys
 LysGluGlyPheTyrAspLeuSerSerGluAspProPheGlyCysLysSerCysAlaCys
 AsnProLeuGlyThrIleProGlyGlyAsnProCysAspSerGluThrGlyHisCysTyr
 CysLysArgLeuValThrGlyGlnHisCysAspGlnCysLeuProGluHisTrpGlyLeu
 SerAsnAspLeuAspGlyCysArgProCysAspCysAspLeuGlyGlyAlaLeuAsnAsn
 SerCysPheAlaGluSerGlyGlnCysSerCysArgProHisMetIleGlyArgGlnCys
 AsnGluValGluProGlyTyrTyrPheAlaThrLeuAspHisTyrLeuTyrGluAlaGlu
 GluAlaAsnLeuGlyProGlyValSerIleValGluArgGlnTyrIleGlnAspArgIle
 ProSerTrpThrGlyAlaGlyPheValArgValProGluGlyAlaTyrLeuGluPhePhe
 IleAspAsnIleProTyrSerMetGluTyrAspIleLeuIleArgTyrGluProGlnLeu
 ProAspHisTrpGluLysAlaValIleThrValGlnArgProGlyArgIleProThrSer
 SerArgCysGlyAsnThrIleProAspAspAspAsnGlnValValSerLeuSerProGly
 SerArgTyrValValLeuProArgProValCysPheGluLysGlyThrAsnTyrThrVal
 ArgLeuGluLeuProGlnTyrThrSerSerAspSerAspValGluSerProTyrThrLeu
 IleAspSerLeuValLeuMetProTyrCysLysSerLeuAspIlePheThrValGlyGly
 SerGlyAspGlyValValThrAsnSerAlaTrpGluThrPheGlnArgTyrArgCysLeu
 GluAsnSerArgSerValValLysThrProMetThrAspValCysArgAsnIleIlePhe
 SerIleSerAlaLeuLeuHisGlnThrGlyLeuAlaCysGluCysAspProGlnGlySer
 LeuSerSerValCysAspProAsnGlyGlyGlnCysGlnCysArgProAsnValValGly
 ArgThrCysAsnArgCysAlaProGlyThrPheGlyPheGlyProSerGlyCysLysPro
 CysGluCysHisLeuGlnGlySerValAsnAlaPheCysAsnProValThrGlyGlnCys
 HisCysPheGlnGlyValTyrAlaArgGlnCysAspArgCysLeuProGlyHisTrpGly
 PheProSerCysGlnProCysGlnCysAsnGlyHisAlaAspAspCysAspProValThr
 GlyGluCysLeuAsnCysGlnAspTyrThrMetGlyHisAsnCysGluArgCysLeuAla
 GlyTyrTyrGlyAspProIleIleGlySerGlyAspHisCysArgProCysProCysPro
 AspGlyProAspSerGlyArgGlnPheAlaArgSerCysTyrGlnAspProValThrLeu
 GlnLeuAlaCysValCysAspProGlyTyrIleGlySerArgCysAspAspCysAlaSer
 GlyTyrPheGlyAsnProSerGluValGlyGlySerCysGlnProCysGlnCysHisAsn

AsnIleAspThrThrAspProGluAlaCysAspLysGluThrGlyArgCysLeuLysCys
 LeuTyrHisThrGluGlyGluHisCysGlnPheCysArgPheGlyTyrTyrGlyAspAla
 LeuGlnGlnAspCysArgLysCysValCysAsnTyrLeuGlyThrValGlnGluHisCys
 AsnGlySerAspCysGlnCysAspLysAlaThrGlyGlnCysLeuCysLeuProAsnVal
 IleGlyGlnAsnCysAspArgCysAlaProAsnThrTrpGlnLeuAlaSerGlyThrGly
 CysAspProCysAsnCysAsnAlaAlaHisSerPheGlyProSerCysAsnGluPheThr
 GlyGlnCysGlnCysMetProGlyPheGlyGlyArgThrCysSerGluCysGlnGluLeu
 PheTrpGlyAspProAspValGluCysArgAlaCysAspCysAspProArgGlyIleGlu
 ThrProGlnCysAspGlnSerThrGlyGlnCysValCysValGluGlyValGluGlyPro
 ArgCysAspLysCysThrArgGlyTyrSerGlyValPheProAspCysThrProCysHis
 GlnCysPheAlaLeuTrpAspValIleAlaGluLeuThrAsnArgThrHisArgPhe
 LeuGluLysAlaLysAlaLeuLysIleSerGlyValIleGlyProTyrArgGluThrVal
 AspSerValGluArgLysValSerGluIleLysAspIleLeuAlaGlnSerProAlaAla
 GluProLeuLysAsnIleGlyAsnLeuPheGluGluAlaGluLysLeuIleLysAspVal
 ThrGluMetMetAlaGlnValGluValLysLeuSerAspThrThrSerGlnSerAsnSer
 ThrAlaLysGluLeuAspSerLeuGlnThrGluAlaGluSerLeuAspAsnThrValLys
 GluLeuAlaGluGlnLeuGluPheIleLysAsnSerAspIleArgGlyAlaLeuAspSer
 IleThrLysTyrPheGlnMetSerLeuGluAlaGluGluArgValAsnAlaSerThrThr
 GluProAsnSerThrValGluGlnSerAlaLeuMetArgAspArgValGluAspValMet
 MetGluArgGluSerGlnPheLysGluLysGlnGluGluGlnAlaArgLeuLeuAspGlu
 LeuAlaGlyLysLeuGlnSerLeuAspLeuSerAlaAlaAlaGluMetThrCysGlyThr
 ProProGlyAlaSerCysSerGluThrGluCysGlyGlyProAsnCysArgThrAspGlu
 GlyGluArgLysCysGlyGlyProGlyCysGlyGlyLeuValThrValAlaHisAsnAla
 TrpGlnLysAlaMetAspLeuAspGlnAspValLeuSerAlaLeuAlaGluValGluGln
 LeuSerLysMetValSerGluAlaLysLeuArgAlaAspGluAlaLysGlnSerAlaGlu
 AspIleLeuLeuLysThrAsnAlaThrLysGluLysMetAspLysSerAsnGluGluLeu
 ArgAsnLeuIleLysGlnIleArgAsnPheLeuThrGlnAspSerAlaAspLeuAspSer
 IleGluAlaValAlaAsnGluValLeuLysMetGluMetProSerThrProGlnGlnLeu
 GlnAsnLeuThrGluAspIleArgGluArgValGluSerLeuSerGlnValGluValIle
 LeuGlnHisSerAlaAlaAspIleAlaArgAlaGluMetLeuLeuGluGluAlaLysArg
 AlaSerLysSerAlaThrAspValLysValThrAlaAspMetValLysGluAlaLeuGlu

GluAlaGluLysAlaGlnValAlaAlaGluLysAlaIleLysGlnAlaAspGluAspIle
 GlnGlyThrGlnAsnLeuLeuThrSerIleGluSerGluThrAlaAlaSerGluGluThr
 LeuPheAsnAlaSerGlnArgIleSerGluLeuGluArgAsnValGluGluLeuLysArg
 LysAlaAlaGlnAsnSerGlyGluAlaGluTyrIleGluLysValValTyrThrValLys
 GlnSerAlaGluAspValLysLysThrLeuAspGlyGluLeuAspGluLysTyrLysLys
 ValGluAsnLeuIleAlaLysLysThrGluGluSerAlaAspAlaArgArgLysAlaGlu
 MetLeuGlnAsnGluAlaLysThrLeuLeuAlaGlnAlaAsnSerLysLeuGlnLeuLeu
 LysAspLeuGluArgLysTyrGluAspAsnGlnArgTyrLeuGluAspLysAlaGlnGlu
 LeuAlaArgLeuGluGlyGluValArgSerLeuLeuLysAspIleSerGlnLysValAla
 ValTyrSerThrCysLeu

SEQ ID No 5: Cadena beta 2 de la laminina humana

MetGluLeuThrSerArgGluArgGlyArgGlyGlnProLeuProTrpGluLeuArgLeu
 GlyLeuLeuLeuSerValLeuAlaAlaThrLeuAlaGlnAlaProAlaProAspValPro
 GlyCysSerArgGlySerCysTyrProAlaThrGlyAspLeuLeuValGlyArgAlaAsp
 ArgLeuThrAlaSerSerThrCysGlyLeuAsnGlyProGlnProTyrCysIleValSer
 HisLeuGlnAspGluLysLysCysPheLeuCysAspSerArgArgProPheSerAlaArg
 AspAsnProHisSerHisArgIleGlnAsnValValThrSerPheAlaProGlnArgArg
 AlaAlaTrpTrpGlnSerGluAsnGlyIleProAlaValThrIleGlnLeuAspLeuGlu
 AlaGluPheHisPheThrHisLeuIleMetThrPheLysThrPheArgProAlaAlaMet
 LeuValGluArgSerAlaAspPheGlyArgThrTrpHisValTyrArgTyrPheSerTyr
 AspCysGlyAlaAspPheProGlyValProLeuAlaProProArgHisTrpAspAspVal
 ValCysGluSerArgTyrSerGluIleGluProSerThrGluGlyGluValIleTyrArg
 ValLeuAspProAlaIleProIleProAspProTyrSerSerArgIleGlnAsnLeuLeu

5

LysIleThrAsnLeuArgValAsnLeuThrArgLeuHisThrLeuGlyAspAsnLeuLeu
 AspProArgArgGluIleArgGluLysTyrTyrTyrAlaLeuTyrGluLeuValValArg
 GlyAsnCysPheCysTyrGlyHisAlaSerGluCysAlaProAlaProGlyAlaProAla
 HisAlaGluGlyMetValHisGlyAlaCysIleCysLysHisAsnThrArgGlyLeuAsn
 CysGluGlnCysGlnAspPheTyrArgAspLeuProTrpArgProAlaGluAspGlyHis
 SerHisAlaCysArgLysCysGluCysHisGlyHisThrHisSerCysHisPheAspMet
 AlaValTyrLeuAlaSerGlyAsnValSerGlyGlyValCysAspGlyCysGlnHisAsn
 ThrAlaGlyArgHisCysGluLeuCysArgProPhePheTyrArgAspProThrLysAsp
 LeuArgAspProAlaValCysArgSerCysAspCysAspProMetGlySerGlnAspGly
 GlyArgCysAspSerHisAspAspProAlaLeuGlyLeuValSerGlyGlnCysArgCys
 LysGluHisValValGlyThrArgCysGlnGlnCysArgAspGlyPhePheGlyLeuSer
 IleSerAspArgLeuGlyCysArgArgCysGlnCysAsnAlaArgGlyThrValProGly
 SerThrProCysAspProAsnSerGlySerCysTyrCysLysArgLeuValThrGlyArg
 GlyCysAspArgCysLeuProGlyHisTrpGlyLeuSerHisAspLeuLeuGlyCysArg
 ProCysAspCysAspValGlyGlyAlaLeuAspProGlnCysAspGluGlyThrGlyGln
 CysHisCysArgGlnHisMetValGlyArgArgCysGluGlnValGlnProGlyTyrPhe
 ArgProPheLeuAspHisLeuIleTrpGluAlaGluAspThrArgGlyGlnValLeuAsp
 ValValGluArgLeuValThrProGlyGluThrProSerTrpThrGlySerGlyPheVal
 ArgLeuGlnGluGlyGlnThrLeuGluPheLeuValAlaSerValProLysAlaMetAsp
 TyrAspLeuLeuLeuArgLeuGluProGlnValProGluGlnTrpAlaGluLeuGluLeu
 IleValGlnArgProGlyProValProAlaHisSerLeuCysGlyHisLeuValProLys

AspAspArgIleGlnGlyThrLeuGlnProHisAlaArgTyrLeullePheProAsnPro
 ValCysLeuGluProGlylleSerTyrLysLeuHisLeuLysLeuValArgThrGlyGly
 SerAlaGlnProGluThrProTyrSerGlyProGlyLeuLeulleAspSerLeuValLeu
 LeuProArgValLeuValLeuGluMetPheSerGlyGlyAspAlaAlaAlaLeuGluArg
 GlnAlaThrPheGluArgTyrGlnCysHisGluGluGlyLeuValProSerLysThrSer
 ProSerGluAlaCysAlaProLeuLeulleSerLeuSerThrLeulleTyrAsnGlyAla
 LeuProCysGlnCysAsnProGlnGlySerLeuSerSerGluCysAsnProHisGlyGly
 GlnCysLeuCysLysProGlyValValGlyArgArgCysAspLeuCysAlaProGlyTyr
 TyrGlyPheGlyProThrGlyCysGlnAlaCysGlnCysSerHisGluGlyAlaLeuSer
 SerLeuCysGluLysThrSerGlyGlnCysLeuCysArgThrGlyAlaPheGlyLeuArg
 CysAspArgCysGlnArgGlyGlnTrpGlyPheProSerCysArgProCysValCysAsn
 GlyHisAlaAspGluCysAsnThrHisThrGlyAlaCysLeuGlyCysArgAspHisThr
 GlyGlyGluHisCysGluArgCyslleAlaGlyPheHisGlyAspProArgLeuProTyr
 GlyGlyGlnCysArgProCysProCysProGluGlyProGlySerGlnArgHisPheAla
 ThrSerCysHisGlnAspGluTyrSerGlnGlnlleValCysHisCysArgAlaGlyTyr
 ThrGlyLeuArgCysGluAlaCysAlaProGlyHisPheGlyAspProSerArgProGly
 GlyArgCysGlnLeuCysGluCysSerGlyAsnilleAspProMetAspProAspAlaCys
 AspProHisThrGlyGlnCysLeuArgCysLeuHisHisThrGluGlyProHisCysAla
 HisCysLysProGlyPheHisGlyGlnAlaAlaArgGlnSerCysHisArgCysThrCys
 AsnLeuLeuGlyThrAsnProGlnGlnCysProSerProAspGlnCysHisCysAspPro
 SerSerGlyGlnCysProCysLeuProAsnValGlnGlyProSerCysAspArgCysAla

ProAsnPheTrpAsnLeuThrSerGlyHisGlyCysGlnProCysAlaCysHisProSer
 ArgAlaArgGlyProThrCysAsnGluPheThrGlyGlnCysHisCysArgAlaGlyPhe
 GlyGlyArgThrCysSerGluCysGlnGluLeuHisTrpGlyAspProGlyLeuGlnCys
 HisAlaCysAspCysAspSerArgGlylleAspThrProGlnCysHisArgPheThrGly
 HisCysSerCysArgProGlyValSerGlyValArgCysAspGlnCysAlaArgGlyPhe
 SerGlyllePheProAlaCysHisProCysHisAlaCysPheGlyAspTrpAspArgVal
 ValGlnAspLeuAlaAlaArgThrGlnArgLeuGluGlnArgAlaGlnGluLeuGlnGln
 ThrGlyValLeuGlyAlaPheGluSerSerPheTrpHisMetGlnGluLysLeuGlylle
 ValGlnGlylleValGlyAlaArgAsnThrSerAlaAlaSerThrAlaGlnLeuValGlu
 AlaThrGluGluLeuArgArgGluIleGlyGluAlaThrGluHisLeuThrGlnLeuGlu
 AlaAspLeuThrAspValGlnAspGluAsnPheAsnAlaAsnHisAlaLeuSerGlyLeu
 GluArgAspArgLeuAlaLeuAsnLeuThrLeuArgGlnLeuAspGlnHisLeuAspLeu
 LeuLysHisSerAsnPheLeuGlyAlaTyrAspSerIleArgHisAlaHisSerGlnSer
 AlaGluAlaGluArgArgAlaAsnThrSerAlaLeuAlaValProSerProValSerAsn
 SerAlaSerAlaArgHisArgThrGluAlaLeuMetAspAlaGlnLysGluAspPheAsn
 SerLysHisMetAlaAsnGlnArgAlaLeuGlyLysLeuSerAlaHisThrHisThrLeu
 SerLeuThrAspIleAsnGluLeuValCysGlyAlaProGlyAspAlaProCysAlaThr
 SerProCysGlyGlyAlaGlyCysArgAspGluAspGlyGlnProArgCysGlyGlyLeu
 SerCysAsnGlyAlaAlaAlaThrAlaAspLeuAlaLeuGlyArgAlaArgHisThrGln
 AlaGluLeuGlnArgAlaLeuAlaGluGlyGlySerIleLeuSerArgValAlaGluThr
 ArgArgGlnAlaSerGluAlaGlnGlnArgAlaGlnAlaAlaLeuAspLysAlaAsnAla

SerArgGlyGlnValGluGlnAlaAsnGlnGluLeuGlnGluLeuIleGlnSerValLys
 AspPheLeuAsnGlnGluGlyAlaAspProAspSerIleGluMetValAlaThrArgVal
 LeuGluLeuSerIleProAlaSerAlaGluGlnIleGlnHisLeuAlaGlyAlaIleAla
 GluArgValArgSerLeuAlaAspValAspAlaIleLeuAlaArgThrValGlyAspVal
 ArgArgAlaGluGlnLeuLeuGlnAspAlaArgArgAlaArgSerTrpAlaGluAspGlu
 LysGlnLysAlaGluThrValGlnAlaAlaLeuGluGluAlaGlnArgAlaGlnGlyIle
 AlaGlnGlyAlaIleArgGlyAlaValAlaAspThrArgAspThrGluGlnThrLeuTyr
 GlnValGlnGluArgMetAlaGlyAlaGluArgAlaLeuSerSerAlaGlyGluArgAla
 ArgGlnLeuAspAlaLeuLeuGluAlaLeuLysLeuLysArgAlaGlyAsnSerLeuAla
 AlaSerThrAlaGluGluThrAlaGlySerAlaGlnGlyArgAlaGlnGluAlaGluGln
 LeuLeuArgGlyProLeuGlyAspGlnTyrGlnThrValLysAlaLeuAlaGluArgLys
 AlaGlnGlyValLeuAlaAlaGlnAlaArgAlaGluGlnLeuArgAspGluAlaArgAsp
 LeuLeuGlnAlaAlaGlnAspLysLeuGlnArgLeuGlnGluLeuGluGlyThrTyrGlu
 GluAsnGluArgAlaLeuGluSerLysAlaAlaGlnLeuAspGlyLeuGluAlaArgMet
 ArgSerValLeuGlnAlaIleAsnLeuGlnValGlnIleTyrAsnThrCysGln
 LysSerSerTrpProGlyArgAlaProAsnLysProVal

SEQ ID No. 6: Cadena gamma 1 de la laminina humana

MetArgGlySerHisArgAlaAlaProAlaLeuArgProArgGlyArgLeuTrpProVal
 LeuAlaValLeuAlaAlaAlaAlaAlaAlaGlyCysAlaGlnAlaAlaMetAspGluCys

5 ThrAspGluGlyGlyArgProGlnArgCysMetProGluPheValAsnAlaAlaPheAsn

ValThrValValAlaThrAsnThrCysGlyThrProProGluGluTyrCysValGlnThr
 GlyValThrGlyValThrLysSerCysHisLeuCysAspAlaGlyGlnProHisLeuGln
 HisGlyAlaAlaPheLeuThrAspTyrAsnAsnGlnAlaAspThrThrTrpTrpGlnSer
 GlnThrMetLeuAlaGlyValGlnTyrProSerSerIleAsnLeuThrLeuHisLeuGly
 LysAlaPheAspIleThrTyrValArgLeuLysPheHisThrSerArgProGluSerPhe
 AlalleTyrLysArgThrArgGluAspGlyProTrpIleProTyrGlnTyrTyrSerGly
 SerCysGluAsnThrTyrSerLysAlaAsnArgGlyPhelleArgThrGlyGlyAspGlu
 GlnGlnAlaLeuCysThrAspGluPheSerAspIleSerProLeuThrGlyGlyAsnVal
 AlaPheSerThrLeuGluGlyArgProSerAlaTyrAsnPheAspAsnSerProValLeu
 GlnGluTrpValThrAlaThrAspIleArgValThrLeuAsnArgLeuAsnThrPheGly
 AspGluValPheAsnAspProLysValLeuLysSerTyrTyrTyrAlalleSerAspPhe
 AlaValGlyGlyArgCysLysCysAsnGlyHisAlaSerGluCysMetLysAsnGluPhe
 AspLysLeuValCysAsnCysLysHisAsnThrTyrGlyValAspCysGluLysCysLeu
 ProPhePheAsnAspArgProTrpArgArgAlaThrAlaGluSerAlaSerGluCysLeu
 ProCysAspCysAsnGlyArgSerGlnGluCysTyrPheAspProGluLeuTyrArgSer
 ThrGlyHisGlyGlyHisCysThrAsnCysGlnAspAsnThrAspGlyAlaHisCysGlu
 ArgCysArgGluAsnPhePheArgLeuGlyAsnAsnGluAlaCysSerSerCysHisCys
 SerProValGlySerLeuSerThrGlnCysAspSerTyrGlyArgCysSerCysLysPro
 GlyValMetGlyAspLysCysAspArgCysGlnProGlyPheHisSerLeuThrGluAla
 GlyCysArgProCysSerCysAspProSerGlySerIleAspGluCysAsnIleGluThr
 GlyArgCysValCysLysAspAsnValGluGlyPheAsnCysGluArgCysLysProGly

PhePheAsnLeuGluSerSerAsnProArgGlyCysThrProCysPheCysPheGlyHis
 SerSerValCysThrAsnAlaValGlyTyrSerValTyrSerIleSerSerThrPheGln
 IleAspGluAspGlyTrpArgAlaGluGlnArgAspGlySerGluAlaSerLeuGluTrp
 SerSerGluArgGlnAspIleAlaValIleSerAspSerTyrPheProArgTyrPhelle
 AlaProAlaLysPheLeuGlyLysGlnValLeuSerTyrGlyGlnAsnLeuSerPheSer
 PheArgValAspArgArgAspThrArgLeuSerAlaGluAspLeuValLeuGluGlyAla
 GlyLeuArgValSerValProLeulleAlaGlnGlyAsnSerTyrProSerGluThrThr
 ValLysTyrValPheArgLeuHisGluAlaThrAspTyrProTrpArgProAlaLeuThr
 ProPheGluPheGlnLysLeuLeuAsnAsnLeuThrSerIleLysIleArgGlyThrTyr
 SerGluArgSerAlaGlyTyrLeuAspAspValThrLeuAlaSerAlaArgProGlyPro
 GlyValProAlaThrTrpValGluSerCysThrCysProValGlyTyrGlyGlyGlnPhe
 CysGluMetCysLeuSerGlyTyrArgArgGluThrProAsnLeuGlyProTyrSerPro
 CysValLeuCysAlaCysAsnGlyHisSerGluThrCysAspProGluThrGlyValCys
 AsnCysArgAspAsnThrAlaGlyProHisCysGluLysCysSerAspGlyTyrTyrGly
 AspSerThrAlaGlyThrSerSerAspCysGlnProCysProCysProGlyGlySerSer
 CysAlaValValProLysThrLysGluValValCysThrAsnCysProThrGlyThrThr
 GlyLysArgCysGluLeuCysAspAspGlyTyrPheGlyAspProLeuGlyArgAsnGly
 ProValArgLeuCysArgLeuCysGlnCysSerAspAsnIleAspProAsnAlaValGly
 AsnCysAsnArgLeuThrGlyGluCysLeuLysCysIleTyrAsnThrAlaGlyPheTyr
 CysAspArgCysLysAspGlyPhePheGlyAsnProLeuAlaProAsnProAlaAspLys
 CysLysAlaCysAsnCysAsnLeuTyrGlyThrMetLysGlnGlnSerSerCysAsnPro

ValThrGlyGlnCysGluCysLeuProHisValThrGlyGlnAspCysGlyAlaCysAsp
 ProGlyPheTyrAsnLeuGlnSerGlyGlnGlyCysGluArgCysAspCysHisAlaLeu
 GlySerThrAsnGlyGlnCysAspIleArgThrGlyGlnCysGluCysGlnProGlyIle
 ThrGlyGlnHisCysGluArgCysGluValAsnHisPheGlyPheGlyProGluGlyCys
 LysProCysAspCysHisProGluGlySerLeuSerLeuGlnCysLysAspAspGlyArg
 CysGluCysArgGluGlyPheValGlyAsnArgCysAspGlnCysGluGluAsnTyrPhe
 TyrAsnArgSerTrpProGlyCysGlnGluCysProAlaCysTyrArgLeuValLysAsp
 LysValAlaAspHisArgValLysLeuGlnGluLeuGluSerLeuIleAlaAsnLeuGly
 ThrGlyAspGluMetValThrAspGlnAlaPheGluAspArgLeuLysGluAlaGluArg
 GluValMetAspLeuLeuArgGluAlaGlnAspValLysAspValAspGlnAsnLeuMet
 AspArgLeuGlnArgValAsnAsnThrLeuSerSerGlnIleSerArgLeuGlnAsnIle
 ArgAsnThrIleGluGluThrGlyAsnLeuAlaGluGlnAlaArgAlaHisValGluAsn
 ThrGluArgLeuIleGluIleAlaSerArgGluLeuGluLysAlaLysValAlaAlaAla
 AsnValSerValThrGlnProGluSerThrGlyAspProAsnAsnMetThrLeuLeuAla
 GluGluAlaArgLysLeuAlaGluArgHisLysGlnGluAlaAspAspIleValArgVal
 AlaLysThrAlaAsnAspThrSerThrGluAlaTyrAsnLeuLeuLeuArgThrLeuAla
 GlyGluAsnGlnThrAlaPheGluIleGluGluLeuAsnArgLysTyrGluGlnAlaLys
 AsnIleSerGlnAspLeuGluLysGlnAlaAlaArgValHisGluGluAlaLysArgAla
 GlyAspLysAlaValGluIleTyrAlaSerValAlaGlnLeuSerProLeuAspSerGlu
 ThrLeuGluAsnGluAlaAsnAsnIleLysMetGluAlaGluAsnLeuGluGlnLeuIle
 AspGlnLysLeuLysAspTyrGluAspLeuArgGluAspMetArgGlyLysGluLeuGlu

ValLysAsnLeuLeuGluLysGlyLysThrGluGlnGlnThrAlaAspGlnLeuLeuAla
 ArgAlaAspAlaAlaLysAlaLeuAlaGluGluAlaAlaLysLysGlyArgAspThrLeu
 GlnGluAlaAsnAspIleLeuAsnAsnLeuLysAspPheAspArgArgValAsnAspAsn
 LysThrAlaAlaGluGluAlaLeuArgLysIleProAlaIleAsnGlnThrIleThrGlu
 AlaAsnGluLysThrArgGluAlaGlnGlnAlaLeuGlySerAlaAlaAlaAspAlaThr
 GluAlaLysAsnLysAlaHisGluAlaGluArgIleAlaSerAlaValGlnLysAsnAla
 ThrSerThrLysAlaGluAlaGluArgThrPheAlaGluValThrAspLeuAspAsnGlu
 ValAsnAsnMetLeuLysGlnLeuGlnGluAlaGluLysGluLeuLysArgLysGlnAsp
 AspAlaAspGlnAspMetMetMetAlaGlyMetAlaSerGlnAlaAlaGlnGluAlaGlu
 IleAsnAlaArgLysAlaLysAsnSerValThrSerLeuLeuSerIleIleAsnAspLeu
 LeuGluGlnLeuGlyGlnLeuAspThrValAspLeuAsnLysLeuAsnGluIleGluGly
 ThrLeuAsnLysAlaLysAspGluMetLysValSerAspLeuAspArgLysValSerAsp
 LeuGluAsnGluAlaLysLysGlnGluAlaAlaIleMetAspTyrAsnArgAspIleGlu
 GluIleMetLysAspIleArgAsnLeuGluAspIleArgLysThrLeuProSerGlyCys
 PheAsnThrProSerIleGluLysPro

REIVINDICACIONES

1. Método para derivar una célula $Isl1^{+}$ multipotente, que comprende la etapa de:
5 (i) cultivar una célula mesenquimatosas en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la célula mesenquimatosas es una célula cardíaca mesenquimatosas, una célula madre embrionaria o fetal, una célula madre de sangre de cordón umbilical,
10 una célula de médula ósea y/o una célula madre amniótica.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt se selecciona del grupo que comprende Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-8, Wnt-8b, y cualquier combinación de las mismas.
15
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una segunda etapa (ii) comprende además expandir la población de células $Isl1^{+}$.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de diferenciación, en el que la etapa de diferenciación comprende cultivar la célula $Isl1^{+}$ en presencia de al menos una laminina seleccionada del grupo que comprende laminina 111, laminina 211, laminina 221, y cualquier combinación de las mismas.
20
6. Método de autorrenovación de una célula $Isl1^{+}$ multipotente, que comprende las etapas de:
25 (i) cultivar una célula $Isl1^{+}$ en presencia de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$, y en un medio que comprende al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt; y,
 (ii) mantener y/o expandir células que pueden obtenerse a partir de la etapa (i) en cultivo.
30
7. Uso de una combinación de al menos una laminina que comprende una cadena $\alpha 5$ y al menos un agente que activa la ruta canónica de Wnt, para derivar una célula $Isl1^{+}$ multipotente.